

Analyse der metabolischen Anpassung von
Streptococcus pneumoniae
an antimikrobielle Umwelteinflüsse

I n a u g u r a l d i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der
Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Greifswald

vorgelegt von

Anne Karla Leonard

Greifswald, den 02.12.2019

Dekan: Prof. Dr. Werner Weitschies

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Lalk

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Eisenreich

Tag der Promotion: 25.02.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
Zusammenfassung.....	9
Summary.....	11
Einleitung	13
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	13
Metabolomics.....	14
Bioanalytische Techniken.....	15
Interne Standards in der Metabolomics	16
Fortschritte im Bereich der Metabolomics in den letzten Jahren	17
Metabolomanalyse von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	17
Natürlicher Lebensraum von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	18
Basismetabolom von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	20
Zentraler Kohlenstoffwechsel	20
Aminosäurestoffwechsel.....	22
Nukleotidstoffwechsel.....	24
Zellwandmetabolismus	25
Antibiotika-induzierte Veränderungen im Metabolom des Bakteriums <i>Streptococcus pneumoniae</i>	26
Stoffwechselveränderungen durch Cefotaxim	27
Stoffwechselveränderungen durch Azithromycin	28
Stoffwechselveränderungen durch Moxifloxacin	28
Stoffwechselveränderungen durch Teixobactin-Arg10.....	31
Abschließende Bemerkungen	34
Literaturverzeichnis.....	35
Artikel I	47
Artikel II	61
Artikel III	71

INHALTSVERZEICHNIS

Eigenständigkeitserklärung	131
Publikationsliste.....	132

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ADS	Arginin-Deiminase-Systems
AEC	Adenylate energy charge (Adenylat-Energieladung)
AMP	Adenosinmonophosphat
ArcD	Arginin-Ornithin-Antiporter
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
CAP	Community-Acquired Pneumonia (Ambulant erworbene Pneumonie)
CDP	Cytidindiphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Koenzym A
CSF	<i>Liquor cerebrospinalis</i>
CTP	Cytidintriphosphat
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EMA	European Medicines Agency
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
GC	Gaschromatografie
GDP	Guanosindiphosphat
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GMP	Guanosinmonophosphat
GSSG	Glutathion-Disulfid
GTP	Guanosintriphosphat
IMP	Inosinmonophosphat
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listera monocytogenes</i>
LC	Liquid chromatography (Flüssigkeitschromatografie)
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid

NeuNAc	N-Acetylneuraminsäure
NIST	National Institute of Standards and Technology
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy (Kernspinresonanzspektroskopie)
P	Phosphat
PBP	Penicillin-Bindeprotein
PEP	Phosphoenolpyruvat
PG	Peptidoglykan
PRPP	Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
PTS	Phosphotransferasesystem
RNA	Ribonukleinsäure
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. thermophilus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
SHMT	Serinhydroxymethyltransferase
TA	Teichonsäure
Tab.	Tabelle
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Zusammenfassung

Das Gram-positive Bakterium *Streptococcus pneumoniae* ist ein humanspezifisches Pathogen des oberen Respirationstraktes. Der opportunistische Krankheitserreger kann jedoch mehrere Organe befallen und tiefer in den Körper vordringen, was zu lokalen Entzündungen wie Sinusitis und Otitis media oder zu lebensbedrohlichen Infektionen wie Pneumonie, Meningitis oder Sepsis führen kann. Für das Bakterium *S. pneumoniae* wurden bisher kaum Metabolom-Daten erhoben. Daher war das Ziel dieser Dissertation eine umfassende Charakterisierung des Metaboloms von *S. pneumoniae*. In dieser Dissertation wurden als analytische Methoden die Gaschromatografie (GC) und Flüssigkeitschromatografie (LC) jeweils gekoppelt mit Massenspektrometrie (MS) sowie die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) verwendet, um die Metaboliten zu analysieren. Es sind mehrere Analysetechniken erforderlich, um den Großteil des Metaboloms mit seinen chemisch verschiedenen Metaboliten zu erfassen. **Artikel I** fasst die Literatur zu Untersuchungen des Metabolismus von *S. pneumoniae* in den letzten Jahren zusammen. Um eine Momentaufnahme des biologischen Systems zum jeweiligen Zeitpunkt zu erhalten, ist neben dem reproduzierbaren Wachstum während der Kultivierung auch die exakte Probenahme zu beachten. Aus diesem Grund wurde in dieser Dissertation ein Probenahmeprotokoll für das Endometabolom von *S. pneumoniae* etabliert (**Artikel II**). Mithilfe des optimierten Protokolls wurde eine umfassende Metabolomanalyse in einem chemisch definierten Medium durchgeführt (**Artikel II**). Um *S. pneumoniae* in einer Umgebung ähnlich der im Wirt zu untersuchen, wurde in einem modifizierten Zellkulturmedium kultiviert. Intermediate zentraler Stoffwechselwege von *S. pneumoniae* wurden analysiert. Das intrazelluläre Stoffwechselprofil wies auf einen hohen glykolytischen Flux hin und bot Einblicke in den Peptidoglykan-Stoffwechsel. Darüber hinaus widerspiegeln die Ergebnisse die biochemische Abhängigkeit von *S. pneumoniae* von aus dem Wirt stammenden Nährstoffen. Ein umfassendes Verständnis der Stoffwechselwege von Pathogenen ist wichtig, um Erkenntnisse über die Anpassungsstrategien während einer Infektion zu gewinnen und so neue Angriffspunkte für Wirkstoffe zu identifizieren.

Die zunehmende Verbreitung von resistenten *S. pneumoniae*-Stämmen zwingt zur Suche nach neuen antibiotisch wirksamen Substanzen. Im Zuge dessen wurde in **Artikel III** die metabolische Reaktion von *S. pneumoniae* während des Wachstums unter dem Einfluss antibakterieller Substanzen mit dem Ziel der Identifizierung metabolischer Anpassungsprozesse untersucht. Dabei wurden Antibiotika mit unterschiedlichen Wirkmechanismen verwendet, wie die Beeinflussung der Zellwandbiosynthese (Cefotaxim, Teixobactin-Arg10), der Proteinbiosynthese (Azithromycin) sowie Nukleotidsynthese

(Moxifloxacin). Es konnten keine Wirkmechanismus-spezifischen Marker-Metaboliten identifiziert werden. Jedes Antibiotikum verursachte weitreichende Veränderungen im gesamten Metabolom von *S. pneumoniae*. Die Nukleotid- und Zellwandsynthese waren am stärksten betroffen. Besonders vielversprechend sind Antibiotika mit zwei Wirkorten wie Teixobactin-Arg10 und Kombinationen aus zwei Antibiotika. In dieser Dissertation wurde das erste Mal das synthetisch hergestellte Teixobactin-Arg10 mittels einer der modernen OMICS-Techniken untersucht. Die vorliegende umfassende Metabolom-Studie bietet wertvolle Erkenntnisse für Forscher, die an der Identifizierung neuer antibakterieller Substanzen arbeiten.

Insgesamt tragen die Ergebnisse der Dissertation zu einem besseren Verständnis der bakteriellen Physiologie bei.

Summary

The Gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* is a human-specific pathogen of the upper respiratory tract. The opportunistic pathogen can infect multiple organs and penetrate deeper into the body, leading to local inflammation such as sinusitis and otitis media. Life-threatening infections such as pneumonia, meningitis or sepsis are possible. *S. pneumoniae* is poorly understood on the metabolome level. Therefore, the aim of this thesis was a comprehensive characterization of the metabolome of *S. pneumoniae*. Within the present thesis, gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC) coupled with mass spectrometry (MS) as well as nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) were used to analyze the metabolome of *S. pneumoniae*, since there are several bioanalytical approaches necessary to investigate the metabolome and its chemically different metabolites. Within this context Article I summarize the known metabolome studies of *S. pneumoniae*.

The basis metabolome of *S. pneumoniae* was elucidated using the aforementioned techniques. Here especially the reproducible growth during the cultivation and the sampling procedure must be developed and optimized. A sampling protocol for the endometabolome of *S. pneumoniae* was established in this study (Article II). Using this optimized protocol, a comprehensive metabolome analysis was performed in the chemically defined medium. To study the metabolome of *S. pneumoniae* in an artificial but close to the environmental conditions medium a modified cell culture medium was used. Intermediates of the central metabolic pathways of *S. pneumoniae* were analyzed. The intracellular metabolic profile indicates a high glycolytic flux and provided insight into the peptidoglycan metabolism. In addition, the results reflect the biochemical dependence of *S. pneumoniae* on host-derived nutrients. A comprehensive understanding of the metabolic pathways of pathogens is important to gain insights into adaptation strategies during infection to identify new drug targets. The presented study is the first comprehensive approach of *S. pneumoniae*.

The increasing prevalence of *S. pneumoniae* strains resistant to commonly used antibiotics is forcing the search for new antimicrobial active substances. The metabolic response of *S. pneumoniae* during growth under the influence of antibacterial substances was investigated aiming to identify metabolic adaptation processes (Article III). Antibiotics with different mechanisms of action were used. Here compounds interfering with cell wall biosynthesis (cefotaxime, teixobactin-Arg10), protein biosynthesis (azithromycin) and nucleotide synthesis (moxifloxacin) and in combination (cefotaxime + azithromycin) were used. Each antibiotic compound resulted in extensive changes in the entire metabolome of *S. pneumoniae* but no distinct biomarker on the metabolome level could be identified.

Nucleotide and cell wall synthesis were the most affected pathways. Particularly promising are antibiotics with two sites of action such as Teixobactin-Arg10 and the combination of two antibiotics. In this dissertation, Teixobactin-Arg10 was investigated for the first time using metabolomics approach. The presented comprehensive metabolome study provides valuable insights for researchers working on the identification of new antibacterial agents.

Overall, the results of the present dissertation contribute to a better understanding of bacterial physiology and the metabolome adaptation of *S. pneumoniae*.

Einleitung

Streptococcus pneumoniae

Entsprechend der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist das pathogene Bakterium *Streptococcus pneumoniae* (auch Pneumokokken genannt) der vierthäufigste Erreger bei mikrobiell-bedingten Erkrankungen und der häufigste Erreger einer bakteriellen Pneumonie und Meningitis [1, 2]. Pneumokokken können asymptomatisch das Nasopharynx besiedeln und milde Infektionen wie Otitis media, Sinusitis und Bronchitis sowie lebensbedrohliche, invasive Infektionen wie Sepsis und Meningitis verursachen [3–5]. Die Übertragung von Pneumokokken erfolgt von Mensch zu Mensch durch Tröpfcheninfektion. Besonders gefährdet sind Säuglinge, Kleinkinder, Ältere und immundefiziente Patienten. Der Nasen-Rachen-Raum von Säuglingen wird im ersten Lebensjahr asymptomatisch besiedelt [3]. Weltweit sterben allerdings rund 1 Millionen Kinder jährlich im Alter unter 5 Jahren an einer Pneumonie [6–8]. Die WHO schätzt, dass jährlich 1,6 Millionen Menschen an einer Pneumokokken-Infektion erkranken [9]. Eine invasive Infektion mit Pneumokokken kann zu einer hohen Morbidität und Mortalität sowie zu dadurch verursachten sozioökonomischen Kosten führen. Auf Grund dieser Faktoren ist es wichtig, die Mechanismen einer Pneumokokken-Infektion besser zu verstehen.

Taxonomisch wird *S. pneumoniae* als Gram-positives Bakterium eingestuft, dass zum Phylum Firmicutes, der Klasse Bacilli, der Ordnung Lactobacillales, der Familie Streptococcaceae, der Gattung *Streptococcus* und der Spezies *Pneumoniae* gehört [10]. Pneumokokken sind kleine Kokken (1 µm), die oval oder lanzettförmig erscheinen und typischerweise als Diplokokken mit einer Kapsel angeordnet sind. Bisher sind 98 verschiedene Kapsel-Serotypen identifiziert [11]. Die Kapsel ist ein wichtiger Virulenzfaktor für die Besiedlung und Pathogenität [12]. Ein typisches Merkmal der Pneumokokken ist die Bildung einer α -Hämolyse auf Blutagarplatten. Die Erythrozyten auf der Blutagarplatte bleiben intakt. Jedoch wird das Eisenatom im Hämoglobin durch Wasserstoffperoxid oxidiert, das durch Pneumokokken ausgeschieden wird. Durch diese Hämolyse wird die von Pneumokokken bedeckte Blutagarplatte grünlich gefärbt [13].

Eine Herausforderung in der Behandlung einer Infektion mit Pneumokokken ist deren steigende Zahl von Antibiotikaresistenzen durch die fehlerhafte Verwendung von Medikamenten. Der erste multiresistente Stamm (Serotyp 19A) wurde in den 1970er Jahren entdeckt [14]. Heutzutage sind bis zu 30 % der Stämme als multiresistent definiert [15, 16]. Eine Pneumonie wird mit β -Lactam-, Makrolidantibiotika, Tetracyclinen und Fluorchinolonen behandelt, u.a. mit Penicillin, Amoxicillin, Cefotaxim, Moxifloxacin, Levofloxacin und

Azithromycin [17]. In den letzten Jahren werden immer mehr Pneumokokken-Stämme entdeckt, die resistent gegen diese klinisch angewendeten Antibiotika sind, u.a. gegen β -Lactam- und Makrolidantibiotika [18]. Diese Resistenzen behindern die Behandlung solcher lebensbedrohlicher Infektionen dramatisch. Zusätzlich können gefährliche Nebenwirkungen dazu führen, dass der Einsatz ganzer Antibiotikaklassen stark eingeschränkt werden muss, wie aktuell von der European Medicines Agency (EMA) für Fluorchinolone geprüft wird. Die Nachfrage nach neuen antimikrobiellen Substanzen ist daher dringend. Für eine weitere erfolgreiche medikamentöse Behandlung gegen Pneumokokken sind neue Forschungsansätze wichtig. Außerdem müssen grundlegende Prozesse sowie Anpassungsmechanismen im bakteriellen Stoffwechsel näher untersucht werden. Hierfür werden aktuell die OMICS-Technologien verwendet. Es wurden mehrere Transkriptom- und Proteomstudien durchgeführt, um die Bedeutung von Antibiotika im Hinblick auf die Pneumokokken-Physiologie zu untersuchen [19–26]. Bisher gab es keine umfassende und vergleichbare Metabolom-Studie, um die Auswirkungen verschiedener Antibiotika auf das Metabolom von *S. pneumoniae* zu analysieren.

Metabolomics

Oliver Fiehn prägte 2001 den Fachbegriff Metabolomics. Damit bezeichnete er die qualitative und quantitative Analyse von biochemischen Prozessen in Organismen [27]. Drei Jahre davor wurde der Begriff Metabolom eingeführt, welches die Gesamtheit der Metaboliten bezeichnet [28, 29]. Metaboliten sind kleine organische Moleküle (<1500 g/mol), die für die Zellfunktion, deren Erhaltung und das Zellwachstum notwendig sind [30]. Das Metabolom ist sehr dynamisch. Der lebende Organismus und somit die Metaboliten reagieren empfindlich auf unterschiedliche und sich verändernde Umweltbedingungen. Das Metabolom von Bakterien unterteilt sich in das Exo- und Endometabolom. Unter dem Begriff Exometabolom werden die Stoffwechselprodukte zusammengefasst, die sich außerhalb der Zelle befinden und somit von der Zelle aufgenommen bzw. sekretiert werden. Die qualitative Analyse des Exometaboloms heißt „metabolic footprinting“ [31]. Intrazelluläre Metaboliten sind Bestandteil des Endometaboloms [32], dessen Analyse auch „metabolic fingerprinting“ genannt wird [33]. Es wird geschätzt, dass sich der Konzentrationsbereich im Metabolom über 7-9 Zehnerpotenzen (pmol/l-mmol/l) erstreckt [34]. In Bakterien wird die Anzahl der Metaboliten auf über 1400 geschätzt [35]. Im Review von Kell *et al.* wurden die Vorteile der Metabolomics gegenüber den anderen OMICS-Technologien herausgearbeitet [32]. Dabei wird hervorgehoben, dass Veränderungen im Metabolom nicht immer auch im Transkriptom und Proteom analog zu finden sind [29, 36]. Das Metabolom kommt dem funktionellen Phänotyp der Zelle oder des Organismus am nächsten [37]. Daher ist das Metabolom

anfälliger für äußere Stressfaktoren und die Metaboliten können die Umwelteinflüsse widerspiegeln [37]. Außerdem kann die Analyse des Metaboloms kostengünstiger erfolgen als Proteom- und Transkriptomanalysen. Die chemische Vielfalt des Metaboloms bietet große Möglichkeiten für die Entdeckung neuer bioaktiver Moleküle. Die Metabolomics kann ein potenziell schnelles und kostengünstiges Mittel zur Identifizierung von Wirkmechanismen von Medikamenten sein, deren Wirkungen durch Stoffwechseländerungen vermittelt werden. Somit ist die Metabolomics ein nützliches Tool bei der Antibiotika-Forschung und kann andere bereits verwendete bioanalytische und molekularbiologische Technologien ergänzen.

Bioanalytische Techniken

In der Metabolomics werden zur Identifizierung und Quantifizierung von Metaboliten hauptsächlich analytische Technologien verwendet. Hierzu zählen Gaschromatografie (GC) [38] und Flüssigkeitschromatografie (LC) [39] gekoppelt mit der Massenspektrometrie (MS), sowie die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) [40]. Durch den Einsatz einer einzelnen Methodik ist es nicht möglich, alle chemisch verschiedenen Metaboliten [41] zu trennen, nachzuweisen und zu quantifizieren [42]. Hierbei sind deren Unterschiede in Polarität, Masse/Ladung, Löslichkeit, Stabilität und Reaktivität zu beachten. Es sind mehrere Analysetechniken erforderlich, um einen möglichst großen Teil des Metaboloms zu erfassen [41]. Alle Techniken haben Vor- und Nachteile in Bezug auf Sensitivität, Stabilität und Trennung der Metaboliten, was jeweils von der verwendeten Methode und der Konfigurationen am Messgerät abhängig ist [43].

Für die Analyse des metabolischen „footprints“ von Pneumokokken wurde die ^1H -NMR-Spektroskopie verwendet. Dabei kann die Aufnahme von Metaboliten aus dem Medium durch wachsende Zellen Informationen über ihren Nährstoffverbrauch geben. Außerdem kann durch die Identität und Menge sekretierter Intermediate und Endprodukte auf die Aktivität des intrazellulären Stoffwechsels geschlossen werden. Hierbei ist es von Vorteil, chemisch definierte Kulturmedien zu nutzen. Komplexe Medien können zu Überlappungen der Signale im NMR-Spektrum führen, was die Quantifizierung stark beeinflusst. Darüber hinaus sind die Bestandteile komplexer Medien teilweise unbekannt und ihre Zusammensetzung ist chargenabhängig und schlecht reproduzierbar. Ein Vorteil der ^1H -NMR-Spektroskopie ist die kurze Messzeit und die Möglichkeit der direkten Quantifizierung. Nachteilig ist jedoch die geringe Empfindlichkeit der NMR-Spektroskopie im direkten Vergleich zu MS-basierten Methoden [44].

Für die Analyse des metabolischen „fingerprints“ von Pneumokokken wurden die HPLC-MS- und die GC-MS-Analyse verwendet. Intrazelluläre Proben enthalten ein breiteres

Spektrum an Metaboliten in viel geringerer Konzentration im Vergleich zu extrazellulären Proben, was eine chromatographische Trennung vor der Detektion sowie viel empfindlichere Detektionsmethoden erfordert. Außerdem muss ein größerer Konzentrationsbereich abgedeckt werden, da die Metaboliten in sehr unterschiedlichen Konzentrationen in den Proben vorliegen können. Die verwendete HPLC-MS Analyse trennt polare Metaboliten unter Verwendung einer Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie mit einem Ionenpaarreagens (Tributylammoniumionen). Es können somit Metaboliten, die negative Ladungen enthalten bzw. deren funktionelle Gruppen deprotonierbar sind (Nukleotide, Zuckerphosphate, organische Säuren), analysiert werden. Bei der GC-MS Analyse können nur volatile Metaboliten gaschromatografisch getrennt werden. Um schwer oder nicht flüchtige Metaboliten wie Kohlenhydrate, Zuckeralkohole, Zuckerphosphate, Aminosäuren, Amine und Fettsäuren analysieren zu können, ist deshalb häufig eine Derivatisierung notwendig. Ein großer Vorteil der GC-MS besteht darin, dass die hauptsächlich verwendete Ionisierungsmethode (Elektronenstoßionisation, 70 eV Ionisierungsenergie) standardisiert und reproduzierbar bei GC-MS-Systemen von verschiedenen Herstellern ist. Dadurch konnten Bibliotheken wie NIST [45], MassBank Datenbank [46] und die Golm Metabolome Datenbank [42, 47] für die Identifizierung der Metaboliten genutzt werden. Ein großer Vorteil der HPLC-MS und GC-MS-Analyse ist neben der hohen Sensitivität vor allem die chromatographische Trennung der Metaboliten vor der massenspektrometrischen Analyse. Beide Techniken ermöglichen es, viele verschiedene Verbindungen zu analysieren, um ein breites Spektrum der Pneumokokken-Metaboliten zu erfassen. Ein Nachteil beider verwendeten Techniken und Messmethoden für die Analyse des intrazellulären Metabolom war die ungefähr doppelt so lange Messzeit im Vergleich zur ^1H -NMR-Spektroskopie. Durch die Derivatisierung vor der GC-MS Analyse war zudem eine längere Probenvorbereitung von 120-480 min notwendig.

Interne Standards in der Metabolomics

Ziel eines typischen Metabolomics-Experiments ist es, möglichst viele Metaboliten zu analysieren. Zur sicheren Identifizierung sind Standardverbindungen erforderlich, von denen die Retentionszeit der Metaboliten bestimmt und Vergleichsspektren aufgenommen werden, um sie später mit den Spektren der Proben zu vergleichen. Zur richtigen Quantifizierung werden interne Standards verwendet. Durch die Standardisierung ist es möglich vergleichbare, zuverlässige, qualitative und quantitative Daten zu liefern [48, 49]. Die internen Standards (chemisch ähnliche Verbindungen oder Metaboliten, die mit stabilen Isotopen wie ^{13}C , ^{15}N und/oder Deuterium markiert sind) haben idealerweise gleiche oder zumindest ähnliche physiko-chemische Eigenschaften wie die physiologisch vorkommenden

Metaboliten, zeigen aber keine Isotopeneffekte und haben meist die gleiche Retentionszeit. Ein Nachteil besteht darin, dass sie nicht zu 100% markiert sind. Daher kann im Massenspektrum ein zusätzliches Signal der unmarkierten Metabolitenmasse auftreten, abhängig vom Markierungsgrad [41]. Außerdem gibt es Bibliotheken, die unter Standardbedingungen Retentionszeiten sowie -indizes für einige Metaboliten enthalten [47]. Die Verfügbarkeit von Standards, die mit stabilen Isotopen markiert sind, ist begrenzt. Der Einsatz solcher internen Standards ist für die Analyse sehr vieler Metaboliten nicht gut praktikabel, da sie sehr kostenintensiv sind. Die größte Bedeutung haben markierte Standards bei der absoluten bzw. relativen Quantifizierung von Metaboliten in intrazellulären Proben. Durch den Zusatz der internen Standards zu den Proben vor ihrer Aufarbeitung durchlaufen Metaboliten und Standards gemeinsam alle Extraktionsschritte, sodass mögliche Verluste oder chemische Veränderungen sowohl Metaboliten als auch Standards betreffen. Bei gleicher Retentionszeit von Metabolit und internem Standard werden außerdem die Auswirkungen möglicher Ionensuppression in der ESI-Quelle der LC-MS ausgeglichen. Somit werden durch den Einsatz dieser Standards besonders gut mögliche Abweichungen während des gesamten Vorgangs der Probenaufarbeitung und Analyse kompensiert.

Fortschritte im Bereich der Metabolomics in den letzten Jahren

Metabolomics ist ein neues dynamisches Feld, das sich ständig weiterentwickelt. In der Vergangenheit war es jedoch auf eine relativ kleine Anzahl von Zielanalyten beschränkt [50]. Die Erkenntnis, dass Stoffwechselwege nicht isoliert sind, sondern als Teil eines umfassenden Netzwerks wirken, hat dazu geführt, dass ein ganzheitlicherer Ansatz für die Metaboliten-Analyse erforderlich ist. Zusammen mit der Proteomics, Transkriptomik und Genomics bildet es einen robusten Rahmen für Wirkstoffforschung und -entwicklung. Die Suche nach Biomarkern dominiert zurzeit als Forschungsgegenstand. Gleichzeitig steigt die Bedeutung der Metabolomics in der personalisierten Medizin und bei toxikologischen Tests. Mit der Einführung der personalisierten Metabolomics können Krankheiten auf molekularer Ebene charakterisiert und deren medikamentöse Behandlung individuell entwickelt werden. Dabei helfen Metabolomics-Studien bei der Charakterisierung von Krankheitsphänotypen und Identifizierung von persönlichen Stoffwechselmerkmalen, die Reaktionen auf die Therapien vorhersagen können [51].

*Metabolomanalyse von *Streptococcus pneumoniae**

Es gibt viele Herausforderungen bei der Metabolom-Probenahme von Pneumokokken. Dabei ist das Wichtigste, dass die endgültige Probe den genauen Status einer lebenden Zelle unter

definierten Versuchsbedingungen widerspiegelt. Ebenso wichtig ist ein reproduzierbares Wachstum der Bakterien, um eine gute Qualität sowie Reproduzierbarkeit der Metaboliten-Daten zu erhalten. Diese Parameter hängen bei einer Pneumokokken-Kultivierung von einer immer gleichen Zusammensetzung des Kulturmediums, Inkubationszeit und Sauerstoffzufuhr ab [52]. Für die Gewinnung einer Exometabolom-Probe erfolgt eine schnelle Filtration zum Trennen der Bakterien vom Medium mit den sekretierten Metaboliten. Dagegen ist die Probenahme des Endometaboloms schwieriger. Hier muss eine Trennung des Exo- und Endometaboloms erfolgen, ein mechanischer Aufschluss der Zellen zum Herauslösen der intrazellulären Metaboliten, die Fällung möglicher störender Komponenten und Metaboliten-Extraktion.

Die Bakterienzellen wurden vom Kulturüberstand mittels eines schnellen vakuumabhängigen Filteransatz abgetrennt. Es wurden anschließend die Pneumokokken-Zellen mit einer kalten isotonischen NaCl-Lösung gewaschen, bevor der Stoffwechsel und somit die enzymatische Aktivität durch Überführung in kaltes Extraktionsmittel und flüssigen Stickstoff gestoppt wurde (**Artikel II**). Dabei war zu beachten, dass die beschriebenen Schritte nicht länger als 90 Sekunden dauerten, um sicherstellen zu können, dass der Stoffwechselstatus der Probe während der Probenahme nicht verändert wurde. Somit konnte eine Momentaufnahme des biologischen Systems zum jeweiligen Zeitpunkt erhalten werden. Gram-positive Bakterien wie Pneumokokken haben eine starre Zellwand, wodurch ein mechanischer Zellaufschluss erforderlich war, um die intrazellulären Metaboliten zu extrahieren.

In der Metabolomics ist die Adenylat-Energieladung (AEC) eine Qualitätskontrolle für die Probenahme, die das Verhältnis von ATP, ADP und AMP widerspiegelt. In lebenden Zellen liegt der AEC über einem Wert von 0,85 [53]. Der AEC ist auch ein interessanter Index für die bakterielle Fitness, um mit einem Umweltstress fertig zu werden. Wenn der AEC nicht mehr im zu erwartenden Bereich ist, kann dies auf die Nährstoffversorgung oder ungünstige Umweltbedingungen zurückzuführen sein. Der AEC wird durch Limitation der Kohlenstoffquelle Glucose beeinflusst, Stickstofflimitation wirkt sich dagegen nicht auf den AEC aus [54]. In dieser Dissertation wurden ¹H-NMR-Spektroskopie, HPLC-MS- und GC-MS-Analysen verwendet, um möglichst viele Metaboliten von Pneumokokken analysieren zu können.

Natürlicher Lebensraum von *Streptococcus pneumoniae*

Der natürliche Lebensraum von Pneumokokken ist die Atemschleimhautoberfläche des menschlichen Nasopharynx. Die Epithelzellen werden durch den Schleim, welcher aus Glykoproteinen (Mucus) besteht, vor Krankheitserreger und Toxinen geschützt.

S. pneumoniae umgeht diesen Abwehrmechanismus durch die negativ geladene Polysaccharidkapsel, die die Sialinreste des mucosen Schleims abstößt [55]. Durch Exoglykosidasen, die von Pneumokokken produziert und sekretiert werden, kann der Schleim abgebaut werden, was zu einer verminderten Schleimviskosität führt [56, 57]. Mucine sind glykolysierte Proteoglykane, die zahlreiche Einheiten von Prolin, Serin oder Threonin als O-Glykosylierungsstellen enthalten [58]. Die O-Glykanketten werden im Golgi-Apparat durch Glykosyltransferasen synthetisiert. Nach der Bindung von *N*-Acetylgalactosamin an Serin oder Threonin werden die Ketten durch Galactose oder *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) verlängert. Die Glykosylierung wird durch ein Molekül Fucose, *N*-Acetylneuraminsäure (NeuNAc) oder Sulfat beendet [58]. Die Aufnahme von essentiellen Nährstoffen ist wichtig für das Wachstum und Überleben von den Bakterien. Pneumokokken verändern die Schleimstruktur durch Exoenzyme wie *N*-Acetylglucosaminidasen, Galactosidasen, Endoglycosidasen, Hydrolyasen, Hyaluronidase und Neuramidase, um die komplexen Polymere in einfache Monomere zu spalten. Darüber hinaus können Pneumokokken den Mucus als Kohlenstoffquelle verwenden [59]. Die meisten von den Pneumokokken genutzten Kohlenhydrate liegen nicht als Monosaccharide vor. Durch den Abbau der Polymeren werden Zelloberflächenrezeptoren freigesetzt, an welche bakterielle Adhäsine binden können und somit wird eine effektive Kolonisation verbessert [60]. NeuNAc ist eines der wichtigsten Kohlenhydrate für *S. pneumoniae*. Die Exoenzyme, die für die Abspaltung von NeuNAc von Mucin verantwortlich sind, sind die drei Neuraminidasen NanA, NanB und NanC [56, 61–63]. Ähnlich wie NanA mobilisiert NanB Sialinsäure als Kohlenstoffquelle von der Schleimhautoberfläche [62, 64]. *S. pneumoniae* ist es möglich, die Schleimhautbarriere zu durchdringen und in den Blutstrom zu gelangen. Durch die Phasenvariation wird die Kapsel von einem undurchsichtigen zu einem transparenten Phänotyp reduziert, was zur Freisetzung von Pneumokokken-Oberflächenadhäsionsmolekülen für die Bindung an das Wirtsepithel führt [65]. Somit ändert sich die Umgebung und damit verbundene Nährstoffzusammensetzung für das Bakterium. Der Hauptteil des Blutes besteht aus Wasser und verschiedener Nährstoffe wie Glukose, Gerinnungsfaktoren, Proteine wie Albumine, Aminosäuren und Elektrolyte [66]. Darüber hinaus können Pneumokokken über den Blutkreislauf in das Zentralnervensystem eindringen, womit die Blut-Hirn-Schranke überquert wird [67]. Das *Liquor cerebrospinalis* (CSF, Gehirnwasser) unterscheidet sich in der Nährstoffzusammensetzung vom Blut, weshalb die Pneumokokken sich wieder an eine neue Umgebung anpassen müssen [68]. Das Gehirnwasser besteht aus Wasser, Proteinen, Elektrolyten, Glukose (in einer geringeren Konzentration als im Blut) sowie Leukozyten und Harnstoff.

Basismetabolom von Streptococcus pneumoniae

In dem Review **Artikel I** (Infection and metabolism – *Streptococcus pneumoanie* metabolism facing the host environment) wurde der bisher bekannte Stoffwechsel aus der Literatur von *S. pneumoniae* zusammengefasst. Im Research **Artikel II** (Metabolic inventory of *Streptococcus pneumoniae* growing in a chemical defined environment) wurde das Metabolom-Probenahmeprotokoll für *S. pneumoniae* TIGR4 Δ cps vorgestellt, sowie ein Überblick über den Metabolismus von *S. pneumoniae* unter chemisch definierten Bedingungen gegeben. Dabei wurden qualitative und quantitative Änderungen der extra- und intrazellulären Metaboliten zeitabhängig untersucht. Intermediate zentraler Stoffwechselwege wie Glykolyse, Pentose-Phosphat-Weg, Aminosäuremetabolismus, Purin- und Pyrimidinsynthese sowie Zellwandmetabolismus wurden analysiert, wobei 117 Metaboliten charakterisiert wurden.

Zentraler Kohlenstoffwechsel

In der Glykolyse werden aus einem Molekül Glukose zwei Moleküle Pyruvat generiert. Dabei werden zwei Moleküle NAD⁺ reduziert und zwei Moleküle ATP produziert. In Abbildung 1 ist der Kohlenstoff- und Aminosäuremetabolismus von *S. pneumoniae* dargestellt. Die in **Artikel II** zusammengefassten Ergebnisse zeigten, dass Pneumokokken die Glykolyse als Hauptstoffwechselweg verwenden [69]. *S. pneumoniae* exprimiert alle Gene, die für die Glykolyse notwendig sind [70, 71]. Pneumokokken transportieren über das PEP-abhängige Phosphotransferasesystem (PTS) Glukose ins Zytoplasma und phosphorylieren sie zu Glukose-6-phosphat [70, 72]. Im Pentosephosphatweg werden für ein Molekül Glukose-6-phosphat zwei Moleküle NADH generiert, welches als Elektronendonator verwendet werden kann [73]. In der Glykolyse wird Glukose-6-phosphat zu Fruktose-6-phosphat über die Glukosephosphatisomerase umgewandelt. Fruktose-1,6-bisphosphat ist in großen Mengen intrazellulär bei den Pneumokokken-Stämmen TIGR4 und D39 zu finden [69, 74]. Interessanterweise sind einige Enzyme der Glykolyse an der Zelloberfläche der Pneumokokken lokalisiert. Diese multifunktionalen Proteine sind die Enolase, Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase und die Fruktosebisphosphat Aldolase. Sie wirken auch als Adhäsine und Virulenzfaktoren [75, 76].

In anderen Organismen wird Pyruvat als Substrat in den Citratzyklus eingeschleust. Genomdaten zeigen, dass Pneumokokken keines der 18 Citratzyklus-Gene enthalten und daher fehlen die Enzyme für den Citratzyklus und die aerobe oxidative Atmung [70]. Infolgedessen wird das erzeugte Pyruvat im fermentativen Stoffwechsel weiter metabolisiert (Abb. 1). Pneumokokken wandeln in einer mikroaerophilen Umgebung unter Generierung von NAD⁺ das gebildete Pyruvat in Laktat um [70, 77]. Eine metabolische Verschiebung von

der homolaktischen (Laktatproduktion) zur gemischten Säurefermentation (Ethanol-, Acetatproduktion, etc.) bei Pneumokokken hängt von der Kohlenhydratquelle ab. Im **Artikel II** zeigten die Pneumokokken eine homolaktische Fermentation *in vitro* [69, 74]. Außerdem wurden in sehr geringer Mengen die Metaboliten der gemischten Säurefermentation detektiert [69]. *In vitro* in Gegenwart von Galaktose kann eine Stoffwechselverschiebung hin zu einer gemischten Säurefermentation beobachtet werden [62, 69]. Ein Teil des aus der Galaktose stammenden Pyruvats wird über Laktatdehydrogenase in Laktat umgewandelt. Mehr als 50% des Pyruvats werden jedoch durch die Pyruvatformiat-Lyase gespalten, wodurch Acetyl-CoA und Formiat gebildet werden. Acetyl-CoA kann durch Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase in Acetat umgewandelt werden, wodurch ATP entsteht [78]. Pneumokokken erzeugen zwei Moleküle NAD⁺ durch die Reduktion von Acetyl-CoA zu Ethanol, katalysiert durch die Acetaldehyd-Dehydrogenase und die Ethanol-Dehydrogenase. Das Endverhältnis zwischen Acetat, Ethanol und Formiat ist 1: 1: 2 [77].

Trotz der fehlenden Citratzyklus-Enzyme konnten, wie in **Artikel II und III** beschrieben, die Metaboliten Fumarat, Succinat und 2-Oxoglutarsäure in den intrazellulären Metabolomproben der Pneumokokken identifiziert werden. Fumarat könnte während der Synthese von Ornithin im Harnstoffzyklus produziert werden, was bisher in der Literatur für Pneumokokken noch nicht beschrieben ist. 2-Oxoglutarsäure ist involviert im Aminosäuremetabolismus und vor allem in der Glutamatdegradierung. Die anderen Metaboliten des Citratzyklus wie Citrat und Malat wurden nicht detektiert.

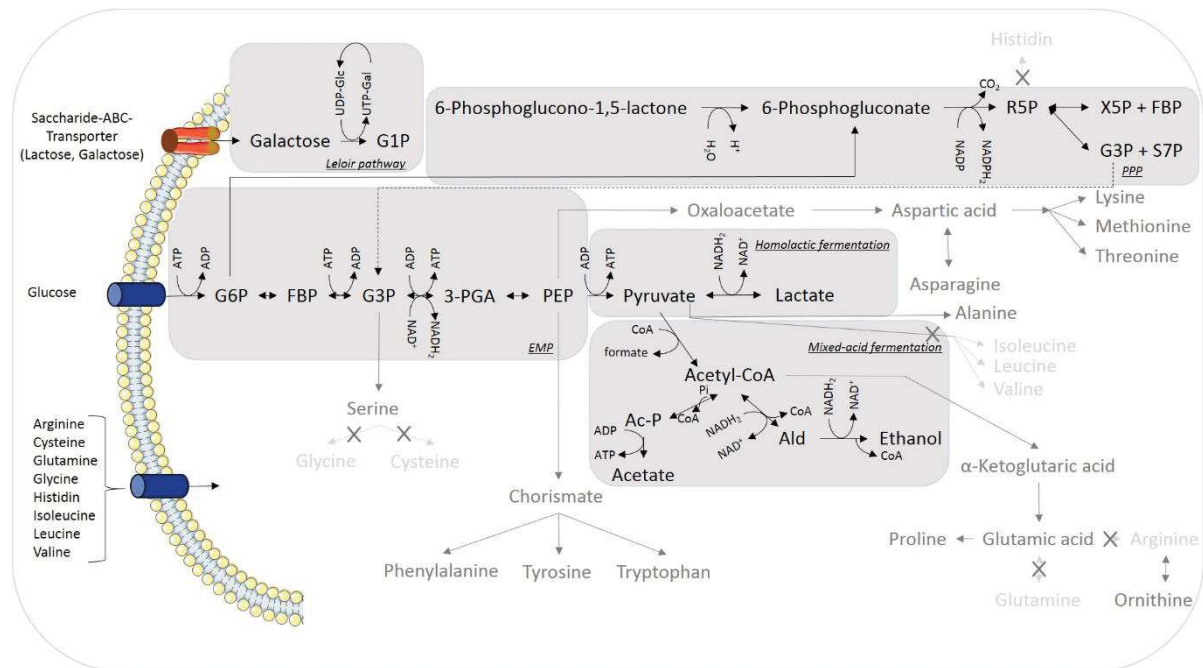


Abbildung 1: Kohlenstoff- und Aminosäuremetabolismus von *S. pneumoniae*. Die Stoffwechselwege sind dunkelgrau hinterlegt (Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)-Weg (Glykolyse), Pentosephosphatweg (PPP), Leloir-Weg, Gärung). Im EMP wird Glukose zu Pyruvat oxidiert. Pyruvat wird durch die homolaktische Fermentation zu Laktat reduziert, wohingegen die gemischte Fermentation zu Acetat, Formiat und Ethanol führt. Galaktose wird umgewandelt zu G1P im Leloir-Weg. Grau dargestellt sind Aminosäuren. Abkürzungen: ABC-Transporter = ATP-Bindung Transporter vom Kassettentyp; UDP-Glc = Uridindiphosphatglukose; UTP-Gal = Uridintriphosphat-Galaktose; G1P = Glukose-1-phosphat; R5P = Ribulose-5-phosphat; X5P = Xylulose-5-phosphat; FBP = Fruktose-6-phosphat; G3P = Glycerinaldehyd-3-phosphat; S7P = Sedoheptulose-7-phosphat; G6P = Glukose-6-phosphat; 3-PGA = 3-Phosphoglycerat; Ac-P = Acetylphosphat; Ald = Acetaldehyd; X = Aminosäuren können nicht synthetisiert werden von *S. pneumoniae*. Modifiziert nach [108].

Aminosäurestoffwechsel

Bei der Wirt-Pathogen-Interaktion können Aminosäuren entscheidend sein. Der Wirt ist auf den Aminosäurestoffwechsel angewiesen, um Abwehrreaktionen gegenüber Krankheitserregern zu unterstützen. Währenddessen nutzen die Krankheitserreger den Aminosäurestoffwechsel zu ihrem eigenen Vorteil, wodurch ein Wettbewerb zwischen Wirt und Pathogen um die Aminosäuren entsteht. Im bakteriellen Stoffwechsel spielen Glutamin und Glutamat eine Schlüsselfunktion. Glutamin dient als Hauptquelle für organische Stickstoff bei den meisten Biosyntheseprozessen von Pneumokokken [69, 79, 80]. Obwohl Pneumokokken unvollständige Biosynthesewege für mehrere Aminosäuren aufweisen, sind Pneumokokken für lediglich acht Aminosäuren auxotroph: Arginin, Cystein, Histidin, Glutamin und Glycin sowie für die verzweigtkettigen Aminosäuren Isoleucin, Leucin und

Valin [80, 81]. Im Gegensatz dazu sind folgende Aminosäuren nicht essentiell für das Wachstum von Pneumokokken: Alanin, Lysin, Aspartat, Asparagin, Threonin und Serin.

Intrazellulär kann Alanin durch die Transaminierung ausgehend von Pyruvat synthetisiert werden [80]. Obwohl Lysin für das Wachstum von *S. pneumoniae* nicht essentiell ist [80], wurde in **Artikel II** eine Abnahme der extrazellulären Konzentration von Lysin festgestellt [69]. Lysin kann für die Peptidoglykanbiosynthese verwendet werden [82]. Die intrazelluläre Konzentration der nicht-essentiellen Aminosäure Aspartat nimmt zu. Aspartat kann beteiligt sein am Harnstoffzyklus, an der Gluconeogenese und/oder der Asparagin-Biosynthese [36]. Oxalacetat ist Vorläufer für die Synthese mehrerer Aminosäuren wie Aspartat, Asparagin, Lysin, Methionin und Threonin (Abb.1). Durch das Fehlen des Citratzyklus verwenden Pneumokokken einen alternativen Weg zur Erzeugung von Oxalacetat. Härtel *et al.* zeigte durch die Anwendung von Isotopologue-Profilung, dass Aspartat und Asparagin nicht über den allgemeinen Weg, einschließlich Pyruvat und Acetyl-CoA, synthetisiert wird [80]. Zunächst wird Oxalacetat aus PEP und CO₂ durch die PEP-Carboxylase synthetisiert. Der Weg ist ähnlich wie bei der PEP-Carboxylierung bei *Enterococcus faecalis* [83–85]. Zum Teil ähnelt das metabolische Netzwerk auch dem in *Listeria monocytogenes* gefundenen, wo Oxalacetat ebenfalls durch eine Carboxylierung gebildet wird. Die Carboxylierung wird jedoch mit Pyruvat und nicht PEP als Substrat durchgeführt. Im Gegensatz zu *S. pneumoniae* produziert *L. monocytogenes* keine PEP-Carboxylase [86]. Als nächstes wird Oxalacetat von der Aspartataminotransferase in Aspartat und Glutamat in α -Ketoglutarat umgewandelt.

Keine der aromatischen Aminosäuren ist für das Wachstum von Pneumokokken essentiell [80]. Im Allgemeinen werden die aromatischen Aminosäuren von Mikroorganismen über den Shikimatweg synthetisiert [87]. Bei dem herkömmlichen Weg sind PEP und Erythrose-4-phosphat die Edukte, aus denen in einer Reihe von Reaktionsschritten das Vorläufermolekül Chorismat gebildet wird. Phenylalanin und Tyrosin werden über den Pentosephosphatweg und PEP gebildet. Dieser Weg wird von *S. pneumoniae* und *L. monocytogenes* genutzt [88].

Die Serinbildung erfolgte durch Hydroxymethylierung von Glycin, bei der eine Hydroxymethylgruppe von 5,10-Methyltetrahydrofolat auf Glycin übertragen und dadurch Serin erzeugt wird. Folglich ist Glycin eine essentielle Aminosäure für das Wachstum von Pneumokokken *in vitro* [80]. Normalerweise wird 3-Phosphoglycerat in drei Schritten zu Serin umgewandelt, aber die für diese Reaktion erforderlichen Enzyme sind in Pneumokokken nicht vorhanden. Die Reaktion von *S. pneumoniae* zur Wiederauffüllung des Serin-Pools ist unter Bakterienarten eher ungewöhnlich. Die meisten Bakterienarten wie *S. thermophilus*

[89, 90] und *L. monocytogenes* [86, 88] bevorzugen die Umwandlung von Serin zu Glycin, katalysiert durch die Serinhydroxymethyltransferase (SHMT).

Während Arginin und Histidin für das Wachstum unbedingt erforderlich sind, verringert auch die Abwesenheit von Glutamin das Wachstum von Pneumokokken [80]. Normalerweise wird Histidin aus Ribose und Glutamin gebildet, jedoch sind die Gene in Pneumokokken nicht vorhanden. Stattdessen wird Histidin mit Transportern aus der Umgebung aufgenommen. Das menschliche Blut enthält freie Aminosäuren in einer Konzentration von ungefähr 2,5 mM, u.a. Glutamin [91]. Glutamin wird bei den meisten Bakterien, z. B. *L. monocytogenes*, aus α -Ketoglutarat synthetisiert, welches durch die Kondensation von Oxalacetat und Acetyl-CoA mit anschließender Decarboxylierung gebildet wird. Das Oxalacetat kommt aus dem vollständigen Citratzyklus [88]. Durch diesen Mechanismus ist Glutamin für viele Bakterien nicht essentiell. Der Mangel an Prolin hat bei Pneumokokken eine wachstumsbegrenzende Wirkung [80]. Prolin wird wie Alanin während des Wachstums sezerniert [69].

Die essentielle Aminosäure Arginin muss aus der Umgebung aufgenommen werden [80]. Die Analyse des Pneumokokken-Genoms zeigte, dass der vollständige Arginin-Biosyntheseweg fehlt [92]. Nur zwei Gene, die an der Argininbiosynthese beteiligt sind, nämlich die Argininosuccinatsynthetase und die Argininosuccinatlase sind kodiert, was aber sehr stammspezifisch ist [92]. Argininosuccinatsynthetase-positive Pneumokokken nehmen das vorhandene Citrullin vom Wirt auf und wandeln es in Arginin um, was das Bakterienwachstum und die Virulenz fördert [93]. In **Artikel II und III** wurde eine Abnahme der Arginin- und eine Zunahme der Ornithinkonzentration extrazellulär beobachtet [69, 94]. Das regulatorische Protein ArgR2 reguliert die Expression des Arginin-Deiminase-Systems (ADS) in *S. pneumoniae* TIGR4 positiv. ArcD wurde als Arginin-Transporter in verschiedenen Bakterien charakterisiert, einschließlich Pneumokokken [95]. Es spielt eine Rolle als Arginin-Aufnahmesystem und beeinflusst die Struktur der Pneumokokken-Kapsel. Das hat wiederum Auswirkungen auf die Pathogenität verschiedener Pneumokokken-Serotypen [95].

Nukleotidstoffwechsel

Nukleotide sind Substrate für die RNA- und DNA-Synthese und dienen als Energiedonor für zelluläre Prozesse in allen Organismen. Einige Nukleotide sind Bestandteil von Koenzymen, während andere zur Aktivierung von Vorläufern in der Polysaccharid- und Lipidsynthese verwendet werden. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse auf der Metabolomebene und Genexpression. Ein übliches Zwischenprodukt im Purin- und im Pyrimidin-Metabolismus ist das α -5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PRPP).

PRPP wird aus Ribose-5-phosphat und ATP durch die PRPP-Synthase gebildet. Die Reaktionen und Enzyme der Purin- und Pyrimidinbiosynthese von *S. pneumoniae* sind kaum erforscht. Das Endprodukt des Pyrimidinbiosyntheseweges ist UMP. Eine Proteom-Studie deutete darauf hin, dass der UMP-Spiegel in Gegenwart von Laktose erhöht ist [96], was auch die enge Verknüpfung zwischen Nukleotidsynthese und den anderen Stoffwechselwegen widerspiegelt. Alle Pyrimidin-Dinukleotide können aus UMP hergestellt werden. Zunächst wird durch die UMP-Kinase UMP zu UDP phosphoryliert und anschließend durch eine NDP-Kinase in UTP umgewandelt [97]. UTP kann weiter in CTP durch die CTP-Synthase umgewandelt werden.

Purin-Nukleotide werden *de novo* aus IMP synthetisiert. Nach dem Intermediat IMP verzweigt sich der Pfad in zwei getrennte Stoffwechselwege, die zu AMP bzw. GMP führen. IMP wird in mehreren Schritten aus PRPP synthetisiert. AMP entsteht durch Aminierung aus IMP. Bei der Reaktion zu GMP wird IMP zuerst durch Oxidation mit NAD^+ als Elektronenakzeptor in XMP umgewandelt. XMP wird anschließend aminiert, wobei die Amidgruppe von Glutamin als Donor und ATP als Energiedonor verwendet wird. In **Artikel II** wurden die Purin-Nukleotide AXP, GXP und die Pyrimidin-Nukleotide UXP und CXP detektiert. ATP wird in Zellen als Cofaktor für die Energieübertragung verwendet. Die Menge an ATP erhöhte sich vom Beginn bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase um das Zweifache [69].

Zellwandmetabolismus

Die Zellwand der Pneumokokken besteht aus Peptidoglykan, an welchen u.a. Teichonsäuren (TA), Glykolipide, Lipoteichonsäuren und Phosphorylcholine angelagert sind [82, 98, 99]. Besonders bei unbekapselten Pneumokokken-Stämmen sind die Zellwandkomponenten essentiell für die Adhäsion der Bakterien an die Epithelzellen [100]. Pyrimidin-Nukleotide spielen eine Rolle bei der Zellwandsynthese. GlcNAc und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) bilden das Rückgrat vom Peptidoglykan bei Pneumokokken. Die Kohlenhydrate werden durch UTP aktiviert, wodurch UDP-GlcNAc entsteht, das anschließend zu UDP-MurNAc reduziert wird [101]. Zellwandvorläuferstufen wie UDP-MurNAc und UDP-GlcNAc für die Peptidoglykansynthese sowie CDP-Ribitol für die TA wurden in **Artikel II** nachgewiesen. Diese Daten bestätigen die Studie von Carvalho *et al.*, welche zeigt, dass die Menge an UDP-GlcNAc mit der Zeit abnimmt [69, 74]. TA sind wesentliche Bestandteile der Zellwand und spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenität der Bakterien [102]. Darüber hinaus kann die Synthese von TA und Peptidoglykan bei der Suche nach Targets für antimikrobielle Verbindungen von Interesse sein. Peptidoglykan ist der häufigste Angriffsort für die wichtigsten klinischen Antibiotika wie β -Lactame und Glycopeptide [103]. Die Grundstruktur

von Peptidoglykan ist eine Kette aus alternierenden MurNAc- und GlcNAc-Einheiten [104, 105]. Die Peptidoglykan-Biosynthese ist für die Integrität und Stabilität der Zellwand von entscheidender Bedeutung. Das Peptidoglykan umgibt die Zelle und schützt sie vor Lyse und hält den Turgordruck stabil [106]. Um das Peptidoglykan befindet sich bei den Pneumokokken eine Kapsel aus Polysacchariden. In dieser Doktorarbeit wurde die unbekapselte Mutante *S. pneumoniae* TIGR4 Δ *cps* verwendet.

Antibiotika-induzierte Veränderungen im Metabolom des Bakteriums *Streptococcus pneumoniae*

Obwohl die Prävention von Erkrankungen durch Pneumokokken im letzten Jahrzehnt aufgrund neu eingeführter und fortgeschrittener Impfstoffe stark vorangeschritten ist, wird die Behandlung von Infektionen mit Pneumokokken immer schwieriger, da Antibiotikaresistenzen gegenüber herkömmlichen Antibiotika zunehmen [107]. Der bakterielle Metabolismus enthält eine Vielzahl von Biosynthesewegen für essentielle Metaboliten, die als Angriffsort für Antibiotika oder Antiinfektiva verwendet werden können. Das Pneumokokken-Metabolom und die Reaktion auf Antibiotika sind noch nicht untersucht worden. Ein umfassendes Verständnis des Stoffwechsel von Krankheitserregern ist aber wichtig, um Einsicht in die Anpassungsstrategien während einer Infektion zu gewinnen und so neue Wirkstoffziele zu identifizieren [108]. Im **Artikel III** (Exploring metabolic adaptation of *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 Δ *cps* to antibiotics; eingereicht) wurde die metabolische Reaktion von *S. pneumoniae* während des Wachstums mit antimikrobiellen Substanzen zur Identifizierung metabolischer Anpassungsprozesse untersucht. Dabei wurden das Exo- und Endometabolom von *S. pneumoniae* TIGR4 Δ *cps* unter antibiotischen Stress und das der unbehandelten Bakterien miteinander verglichen. Die untersuchten Antibiotika decken ein breites Spektrum verschiedener Angriffsziele in prokaryotischen Zellen ab, wie die bakterielle Zellwandsynthese (Cefotaxim und Teixobactin-Arg10), die Proteintranslation (Azithromycin) und die DNA-Replikation und –Transkription (Moxifloxacin). Das Metabolom wurde über einen Zeitraum von zwei Stunden nach der Antibiotikazugabe zu ausgewählten Zeitpunkten untersucht (**Artikel III**). Insgesamt wurden 124 Metaboliten mittel ^1H -NMR, HPLC-MS und GC-MS analysiert, die nahezu alle primären Stoffwechselwege abdecken (Tab. 1). Es zeigte sich, dass die Antibiotikagabe meist global auf mehrere Stoffwechselwege wirkte und somit keine Marker-Metaboliten spezifisch für einen bestimmten Antibiotika-Stress zu finden waren.

Tabelle 1: Anzahl intrazellulärer Metaboliten mit signifikant veränderten Konzentrationen von *Streptococcus pneumoniae* nach Antibiotika-Stress ($p \leq 0,05$, two way-ANOVA mit Šidák Test), [109].

	cefotaxime		azithromycin		cefotaxime+ azithromycin		moxifloxacin		teixobactin-Arg10	
	increased	decreased	increased	decreased	increased	decreased	increased	decreased	increased	decreased
carbon metabolism	9	5	2	3	13	4	6	4	8	4
amino acid metabolism	17	2	1	3	18	2	4	2	11	5
nucleotide metabolism	2	18	0	15	3	18	11	10	2	20
cell wall precursors	2	4	1	5	4	3	4	2	5	3
other intermediates	2	2	0	2	3	5	4	1	3	4
total	63		32		73		48		65	

Stoffwechselveränderungen durch Cefotaxim

Cefotaxim gehört zur dritten Generation der Cephalosporine, die eine Gruppe der β -Lactamantibiotika sind [110]. Cefotaxim hemmt die Zellwandsynthese, indem es das Penicillin-Bindeprotein (PBP) hemmt, was zu einer Blockade der Zellteilung und somit zur Lyse der Pneumokokken führt. PBPs sind membranassoziierte Enzyme, die den letzten Schritt der Zellwandsynthese katalysieren [111]. Cefotaxim wird rasch zu Desacetylcefotaxim desacetyliert, was ein ähnliches antimikrobielles Spektrum wie Cefotaxim aufweist [112]. Cephalosporine wie Cefotaxim wurden entwickelt, um penicillinresistente Bakterien zu eliminieren oder auch Menschen mit Penicillin-Allergie zu behandeln [112]. Die Penicillin-Allergie ist die häufigste Medikamentenallergie und ist bei bis zu 15% der stationären Patienten beschrieben [113]. In **Artikel III** beschreiben wir, wie die Zugabe von Cefotaxim den Pool der Aminosäuren sowie der Nukleotide veränderte (Tab. 1). Die Wirkung erhöhter Aminosäurespiegel kann eine Stressantwort der Pneumokokken auf Antibiotika sein [80]. Besonders hohe Zunahmen in den Konzentrationen gegenüber der Kontrolle zeigten Glutamin und Glutamat. Glutamin ist der wichtige Stickstoffdonator für die Purin- und Pyrimidinbiosynthese und für die Synthese der Zellwand [114].

S. pneumoniae hat die Fähigkeit Resistenzen gegen die kommerziellen Medikamente zu entwickeln. Kombinationen von mehreren Antibiotika senken das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko bei einer polymikrobiellen CAP und verbessern die Prognose. Die in **Artikel III** zusammengefassten Ergebnisse stellen die erste Metabolom-Studie, die eine Stressanpassung von *S. pneumoniae* nach einem Kombinationstress aus Cefotaxim und Azithromycin analysiert, dar. Die Behandlung mit einer Kombination von Cefotaxim und Azithromycin führte zu einer globalen Veränderung des Metaboloms von *S. pneumoniae* (Tab. 1). Dabei zeigte die Kombinationsgabe hauptsächlich die gleichen Auswirkungen auf

das Pneumokokken-Metabolom wie die alleinige Gabe von Cefotaxim. Glutathion wird häufig als Marker für oxidativen Stress verwendet [115]. Allerdings verursachte die Kombinationsbehandlung aus Cefotaxim und Azithromycin einen veränderten GSSG-Spiegel bei den Pneumokokken. Somit scheint der oxidative Stress in der Kombination im Vergleich zu den Kontroll- und anderen Stressbedingungen erhöht zu sein.

Stoffwechselveränderungen durch Azithromycin

Azithromycin ist ein Makrolid-Antibiotikum und ein Derivat von Erythromycin sowie wirksam gegen pathogene Bakterien, die für eine Infektion der Atemwege und der Haut des Menschen verantwortlich sind [116]. Kennzeichnend für die Struktur von Makrolidantibiotika ist eine makrozyklische Struktur mit einem 14- bis 16-gliedrigen Laktoring mit glykosidisch gebundenen Aminosuktern. Azithromycin weist einen 15-gliedrigen Makrolidring mit einer Cladinose-Einheit auf [117]. Azithromycin hemmt die Proteinbiosynthese und somit das bakterielle Wachstum und die Replikation, indem Azithromycin die 50S-Untereinheit der 70S ribosomalen Ribonukleinsäure (RNA) bindet. Dabei wird das Enzym Translokase blockiert und der Transport der transferRNA (tRNA)-Polypeptidkette kann nicht von der Donor- zur Akzeptorstelle erfolgen [117]. Zusätzlich haben Makrolide eine starke entzündungshemmende Wirkung, indem sie die Funktion der Neutrophilen beeinflussen [118, 119]. Außerdem hemmen Makrolide die Anheftung des Bakteriums an respiratorische Epithelzellen und verringern die Produktion von Virulenzfaktoren [120, 121]. Makrolidstress in *S. aureus* führte zur Blockade der Peptidbiosynthese, was sich in einer stärkeren Aminosäuresynthese von Lysin und Threonin zeigte [122]. Pneumokokken mit Azithromycinstress zeigen diese Veränderung nicht (**Artikel III**, Tab. 1). Nur die Nukleotidsynthese war verändert. Interessanterweise können Makrolide durch ATP-abhängige Effluxpumpen aus der Bakterienzelle sekretiert werden [123, 124]. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass mit Azithromycin behandelte Pneumokokken die geringste metabolische Veränderung verglichen mit den anderen Stressbedingungen zeigten.

Stoffwechselveränderungen durch Moxifloxacin

Moxifloxacin ist ein wirksames Antibiotikum zur Behandlung verschiedener Infektionen der Atemwege. *In vitro* wurden entzündungshemmende Eigenschaften von Moxifloxacin detektiert, wie die Hemmung der pro-inflammatorischen Cytokinproduktion in Monozyten und respiratorischen epithelialen Zelllinien [125–128]. Eine klinische Studie zeigte ein verbessertes Überleben von CAP-Patienten unter Moxifloxacinbehandlung im Vergleich zu einer β -Lactam-Monotherapie [129], was möglicherweise auf die immunmodulatorischen

Wirkungen von Moxifloxacin zurückzuführen ist. Moxifloxacin wirkt durch Bindung an die Topoisomerase II (DNA-Gyrase) und verhindert somit die Replikation, Transkription und Reparatur bakterieller DNA [130]. Pneumokokken scheinen weniger resistent gegen 8-Methoxy-chinolone wie Moxifloxacin im Vergleich zu früheren Fluorchinolonen zu sein [131].

Moxifloxacin beeinflusst die Intermediate der Nukleotidbiosynthese (**Artikel III**, Tab. 1). Die Behandlung von Pneumokokken mit Moxifloxacin verursacht Doppelstrangbrüche im bakteriellen Chromosom [23]. In *Streptococcus faecalis* führt die Hemmung der DNA- und RNA-Synthese zu einer Blockade bei der Septumbildung und zu einer dickeren Zellwand [132]. Die dickere Zellwand wurde im **Artikel III** auch für *S. pneumoniae* bestätigt sowie eine Veränderung in den Zellwand-Vorstufen (Abb. 2).

Das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte weist mit dem Bescheid vom März 2019 auf schwere und potentiell irreversible Nebenwirkungen der Fluorchinolone hin, wozu auch Moxifloxacin gehört. Diese Fluorchinolone dürfen ab Mai 2019 nur noch nach einer Nutzen-Risiko-Abwägung angewendet werden, sowie wenn keine alternativen Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung stehen [133].

EINLEITUNG

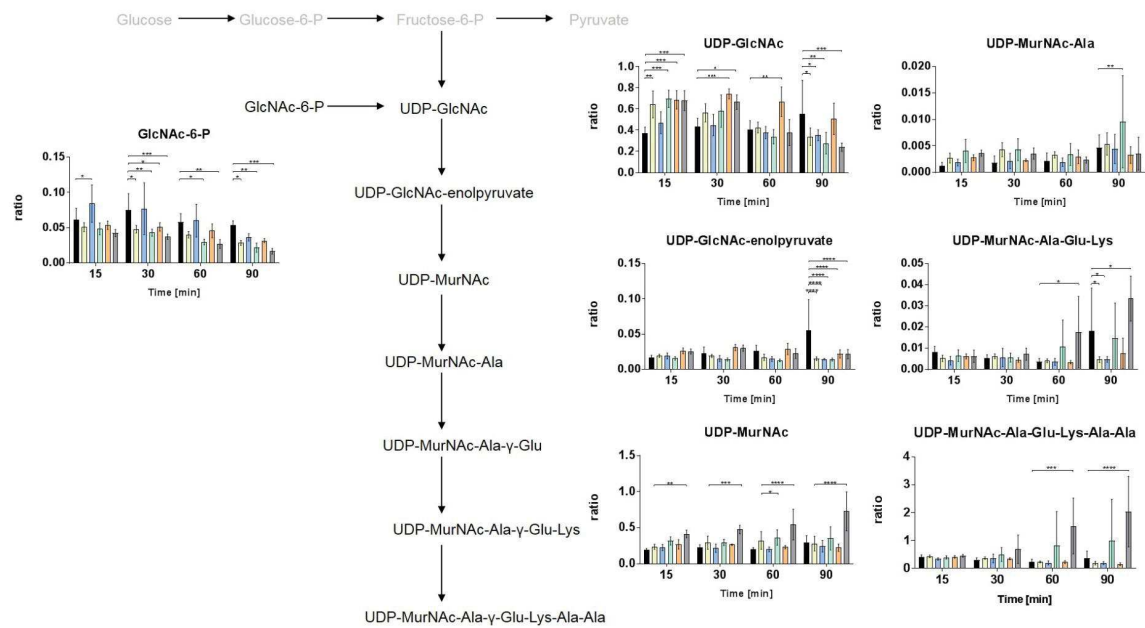


Abbildung 2: Zwischenprodukt der Peptidoglykan-Biosynthese von *S. pneumoniae* TIGR4Δcps. Relative intrazelluläre Mengen der detektierten Metaboliten der Peptidoglykan-Biosynthese werden als Balkendiagramme dargestellt. Balken sind farbig gekennzeichnet abhängig vom der Stressbedingung: Kontrolle (Schwarz), Cefotaxim (Gelb), Azithromycin (Blau), Kombination aus Cefotaxim und Azithromycin (Grün), Moxifloxacin (Orange) und Teixobactin-Analogue (Grau). Sternchen zeigen signifikante *p*-Werte (two-way ANOVA, $\alpha = 0,05$ nach Holm-Sidak-Korrektur, $n = 4-5$) zwischen den behandelten Zellen und der Kontrolle an. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$ [109].

Stoffwechselveränderungen durch Teixobactin-Arg10

Bakterien bilden verstärkt Resistenzen gegen Antibiotika, was eine der größten Bedrohungen für die menschliche Gesundheit darstellt [134]. In den letzten Jahren wurden nur zwei neue Antibiotikaklassen entdeckt [135]. Im Jahre 2015 wurde erfolgreich aus dem nichtkultivierbaren Organismus *Eleftheria terrae* ein zyklisches Depsipeptid isoliert [136]. Dieses Molekül wurde Teixobactin genannt und ist gegen Gram-positive Bakterien wirksam und soll bisher keine Resistenzentwicklung bei den Bakterien zeigen. Es greift an mehreren Stellen der Zellwandbiosynthese an, wodurch vermutlich die Resistenzbildung erschwert wird. Teixobactin bindet an die Pyrophosphatmotive von Lipid II (Vorläufer vom PG) und Lipid III (Vorläufer von TA) [136]. Die Umsetzung von der Isolierung bis zur klinischen Anwendung und somit Marktreife ist ein langwieriger Prozess und wird mehrere Jahre dauern. Ein großer Nachteil der antimikrobiellen Substanz ist, dass Teixobactin ein natürliches vorkommendes Molekül und dadurch nur in geringer Menge verfügbar ist. Zur Erhöhung des therapeutischen Potentials von Teixobactin entwickelten Parmar *et al.* ein neues Design von Teixobactin und eine effektive Synthese zur Gewinnung von Teixobactinderivaten [137]. Diese Teixobactinderivate sind leicht in größerer Ausbeute zu produzieren und haben eine bessere antibakterielle Aktivität als der Naturstoff selbst. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Teixobactinderivat, Teixobactin-Arg10, zeigt in *S. aureus* ein 16-fach höheres Potential zum Abtöten der MRSA-Stämme als Vancomycin. Ebenso weist das synthetisch produzierte Teixobactin keine Resistenzbildung auf [137]. **Artikel III** beschreibt die erste Studie, welche die Auswirkungen eines Teixobactinderivats auf den bakteriellen Stoffwechsel mittels OMICS-Technologien untersucht. Es zeigte sich eine globale Veränderung des Metaboloms durch das Teixobactin-Arg10 (**Artikel III**, Tab. 1). Besonders interessant ist die Veränderung des Arginin- und Ornithinlevels durch den antimikrobiellen Stress mit Teixobactin-Arg10 (Abb. 3). Der Arginin-Ornithin-Antiporter (ArcD) ist essentiell für die Virulenz von *S. pneumoniae* TIGR4 [94]. Aufgrund des unvollständigen Argininbiosyntheseweges ist Arginin essentiell für Pneumokokken und muss aus der Umgebung aufgenommen werden [80, 94].

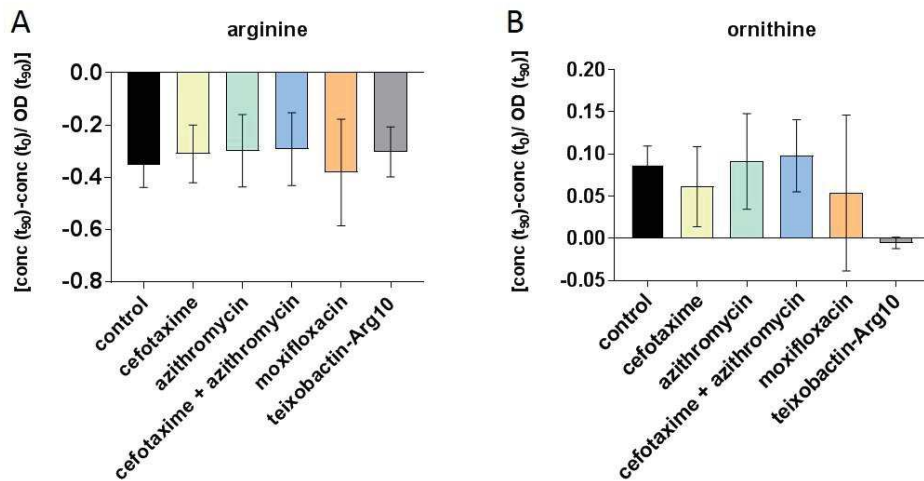


Abbildung 3: Darstellung der extrazellulären Aufnahme von Arginin (A) und der Akkumulation von Ornithin (B) unter Kontrollbedingung und nach Zugabe von Antibiotika-Stress (t_{90}). Balken sind farbig gekennzeichnet abhängig vom der Stressbedingung: Kontrolle (Schwarz), Cefotaxim (Gelb), Azithromycin (Blau), Kombination aus Cefotaxim und Azithromycin (Grün), Moxifloxacin (Orange) und Teixobactin-Analogon (Grau). Dargestellt sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung. n=4-5 [109].

Eine weitere Auffälligkeit wurde in der Rasterelektronenmikroskopie bei den Pneumokokken, die mit Teixobactin-Arg10 gestresst wurden, gefunden. Teixobactin-Arg10 führte zu einer defekten Zelloberfläche von *S. pneumoniae* TIGR4 Δ cps (Abb. 4). Eine verstärkte Zelllyse wurde auch bei Behandlung von *S. aureus* mit dem natürlich vorkommenden Teixobactin beobachtet [138].

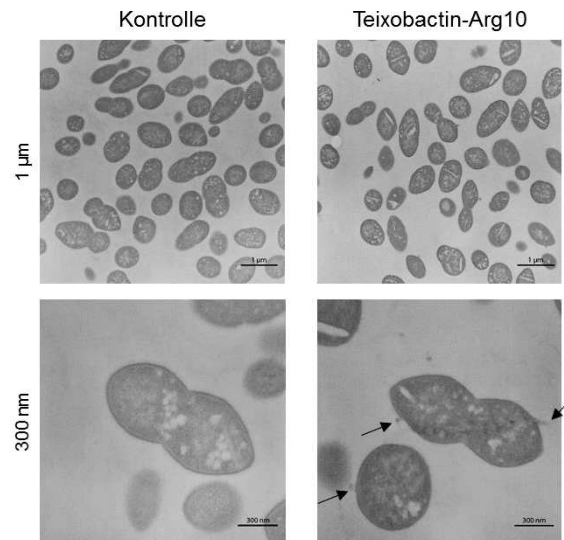


Abbildung 4: Transmissionselektronenmikroskopie Aufnahmen von *S. pneumoniae* TIGR4 Δ *cps*, die in modifizierten RPMI-Medium unter Kontrollbedingung und nach Zugabe von Teixobactin-Arg10 wuchsen. Die Pfeile weisen auf eine defekte Zelloberfläche hin. Skala 1 μ m = 10000 fache Vergrößerung, Skala 300 nm = 35970 fache Vergrößerung. Modifiziert nach [109].

Abschließende Bemerkungen

Metabolom-Analysen erfahren ein stetig steigendes wissenschaftliches Interesse und die kontinuierliche Entwicklung und Erweiterung der bioanalytischen Methoden der Metabolomics zeigt in einer Vielzahl von Publikationen den immensen Stellenwert dieser OMICS-Technologie. In dieser Doktorarbeit werden neue grundlegende Informationen über die bakterielle Physiologie und den Metabolismus von *S. pneumoniae* TIGR4 Δ *cps* gezeigt. Der Aminosäuremetabolismus, Nukleotid- und Zellwandsynthese sind hier insbesondere zu nennen. Die Ergebnisse bestätigen, dass diese Stoffwechselwege vielversprechende Ziele für neue Antibiotika darstellen können. Der Einsatz von Antibiotika mit zwei Wirkorten wie das Teixobactin-Arg10 und die Kombination aus zwei herkömmlichen Antibiotika scheint besonders vielversprechend zu sein. In dieser Doktorarbeit zeigte die Kombination aus Cefotaxim und Azithromycin die meisten Veränderungen im Metabolom von *S. pneumoniae* im Vergleich zu den anderen Stressbedingungen. Diese Arbeit bietet wertvolle Erkenntnisse für Forscher, die an der Identifizierung und Charakterisierung neuer antibakterieller Substanzen arbeiten da nunmehr die Basis für die Analyse von Stoffwechselveränderungen gegeben ist. Neue Behandlungsstrategien bei Infektionen mit bakteriellen Pathogenen wie Pneumokokken sind dringend erforderlich. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit sollten zukünftige Studien die *in vivo* Situation besser widerspiegeln. *In vivo* Infektionsansätze sind erforderlich, um ein besseres Verständnis der Wechselwirkung zwischen *S. pneumoniae* und dem Wirtszellstoffwechsel zu erlangen. Die Ergebnisse dieser Arbeit können sich als geeignet für integrative OMICS-Studien erweisen. Die Kombination aus Metabolomics, Transcriptomic und Proteomics bietet das Potential, komplexe biochemische Netzwerke und Regulationssysteme von *S. pneumoniae* aufzuklären.

Literaturverzeichnis

1. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M (2005) The global burden of group A streptococcal diseases. *The Lancet. Infectious diseases* 5(11), 685–694. 10.1016/S1473-3099(05)70267-X.
2. World Health Organization (2015) Pneumoniae: Fact sheet N°331, Updated November 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/>.
3. Bogaert D, Groot R de, Hermans PWM (2004) Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. *The Lancet. Infectious diseases* 4(3), 144–154. 10.1016/S1473-3099(04)00938-7.
4. Orihuela C, Brown J, Hammerschmidt S (eds.) (2015) Streptococcus pneumoniae: Molecular mechanisms of host-pathogen interactions. Amsterdam: Academic Press.
5. Austrian R (1999) The pneumococcus at the millennium: Not down, not out. *The Journal of infectious diseases* 179 Suppl 2, S338–41. 10.1086/513841.
6. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, Mulholland K, Levine OS, Cherian T (2009) Burden of disease caused by Streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: Global estimates. *Lancet (London, England)* 374(9693), 893–902. 10.1016/S0140-6736(09)61204-6.
7. World Health Organization Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf.
8. Gamez G, Hammerschmidt S (2012) Combat pneumococcal infections: Adhesins as candidates for protein-based vaccine development. *Current drug targets* 13(3), 323–337.
9. World Health Organization (2013) Progress in introduction of pneumococcal conjugate vaccine worldwide, 2000–2012. *Releve epidemiologique hebdomadaire* 88(17), 173–180.
10. Facklam R (2002) What happened to the streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical microbiology reviews* 15(4), 613–630.
11. Hammerschmidt S, Rohde M (2019) Electron Microscopy to Study the Fine Structure of the Pneumococcal Cell. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1968, 13–33. 10.1007/978-1-4939-9199-0_2.
12. Kumar K L R, Ganaie F, Ashok V (2013) Circulating Serotypes and Trends in Antibiotic Resistance of Invasive Streptococcus Pneumoniae from Children under Five in Bangalore. *Journal of clinical and diagnostic research JCDR* 7(12), 2716–2720. 10.7860/JCDR/2013/6384.3741.
13. Tai SS, Lee CJ, Winter RE (1993) Hemin utilization is related to virulence of Streptococcus pneumoniae. *Infection and immunity* 61(12), 5401–5405.
14. Jacobs MR, Koornhof HJ, Robins-Browne RM, Stevenson CM, Vermaak ZA, Freiman I, Miller GB, Witcomb MA, Isaäcson M, Ward JI, Austrian R (1978) Emergence of multiply resistant pneumococci. *The New England journal of medicine* 299(14), 735–740. 10.1056/NEJM197810052991402.

15. Lynch JP, Zhanell GG (2009) *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiology, risk factors, and strategies for prevention. *Seminars in respiratory and critical care medicine* 30(2), 189–209. 10.1055/s-0029-1202938.
16. Link-Gelles R, Thomas A, Lynfield R, Petit S, Schaffner W, Harrison L, Farley MM, Aragon D, Nicols M, Kirley PD, Zansky S, Jorgensen J, Juni BA, Jackson D, Moore MR, Lipsitch M (2013) Geographic and temporal trends in antimicrobial nonsusceptibility in *Streptococcus pneumoniae* in the post-vaccine era in the United States. *The Journal of infectious diseases* 208(8), 1266–1273. 10.1093/infdis/jit315.
17. Ewig S, Höffken G, Kern WV, Rohde G, Flick H, Krause R, Ott S, Bauer T, Dalhoff K, Gatermann S, Kolditz M, Krüger S, Lorenz J, Pletz M, Roux A de, Schaaf B, Schaberg T, Schütte H, Welte T (2016) Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und Prävention - Update 2016. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 70(3), 151–200. 10.1055/s-0042-101873.
18. Cillóniz C, Ardanuy C, Vila J, Torres A (2016) What is the clinical relevance of drug-resistant pneumococcus? *Current opinion in pulmonary medicine* 22(3), 227–234. 10.1097/MCP.0000000000000262.
19. El Khoury JY, Boucher N, Bergeron MG, Leprohon P, Ouellette M (2017) Penicillin induces alterations in glutamine metabolism in *Streptococcus pneumoniae*. *Sci. Rep.* 7(1), 14587. 10.1038/s41598-017-15035-y.
20. Fani F, Brotherton M-C, Leprohon P, Ouellette M (2013) Genomic analysis and reconstruction of cefotaxime resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 68(8), 1718–1727. 10.1093/jac/dkt113.
21. La Campa AG de, Ferrándiz MJ, Martín-Galiano AJ, García MT, Tirado-Vélez JM (2017) The Transcriptome of *Streptococcus pneumoniae* Induced by Local and Global Changes in Supercoiling. *Frontiers in microbiology* 8, 1447. 10.3389/fmicb.2017.01447.
22. Marrer E, Satoh AT, Johnson MM, Piddock LJV, Page MGP (2006) Global transcriptome analysis of the responses of a fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutant and its parent to ciprofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50(1), 269–278. 10.1128/AAC.50.1.269–278.2006.
23. Ferrándiz MJ, Martín-Galiano AJ, Arnanz C, Zimmerman T, La Campa AG de (2016) Reactive Oxygen Species Contribute to the Bactericidal Effects of the Fluoroquinolone Moxifloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60(1), 409–417. 10.1128/AAC.02299-15.
24. Chandra Mohana N, Yashavantha Rao HC, Rakshith D, Mithun PR, Nuthan BR, Satish S (2018) Omics based approach for biodiscovery of microbial natural products in antibiotic resistance era. *Journal, genetic engineering & biotechnology* 16(1), 1–8. 10.1016/j.jgeb.2018.01.006.
25. Rogers PD, Liu TT, Barker KS, Hilliard GM, English BK, Thornton J, Swiatlo E, McDaniel LS (2007) Gene expression profiling of the response of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 59(4), 616–626. 10.1093/jac/dkl560.
26. Ng W-L, Kazmierczak KM, Robertson GT, Gilmour R, Winkler ME (2003) Transcriptional Regulation and Signature Patterns Revealed by Microarray Analyses of *Streptococcus*

- pneumoniae R6 Challenged with Sublethal Concentrations of Translation Inhibitors. *Journal of bacteriology* 185(1), 359–370. 10.1128/JB.185.1.359–370.2003.
27. Fiehn O (2001) Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comparative and functional genomics* 2(3), 155–168. 10.1002/cfg.82.
 28. Tweeddale H, Notley-McRobb L, Ferenci T (1998) Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("metabolome") analysis. *Journal of bacteriology* 180(19), 5109–5116.
 29. Oliver SG, Winson MK, Kell DB, Baganz F (1998) Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends in biotechnology* 16(9), 373–378.
 30. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass spectrometry reviews* 26(1), 51–78. 10.1002/mas.20108.
 31. Allen J, Davey HM, Broadhurst D, Heald JK, Rowland JJ, Oliver SG, Kell DB (2003) High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. *Nature biotechnology* 21(6), 692–696. 10.1038/nbt823.
 32. Kell DB, Brown M, Davey HM, Dunn WB, Spasic I, Oliver SG (2005) Metabolic footprinting and systems biology: The medium is the message. *Nature reviews. Microbiology* 3(7), 557–565. 10.1038/nrmicro1177.
 33. Fiehn O (2002) Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant molecular biology* 48(1-2), 155–171.
 34. Dunn WB, Ellis DI (2005) Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24(4), 285–294. 10.1016/j.trac.2004.11.021.
 35. Lee D-S, Burd H, Liu J, Almaas E, Wiest O, Barabási A-L, Oltvai ZN, Kapatral V (2009) Comparative genome-scale metabolic reconstruction and flux balance analysis of multiple *Staphylococcus aureus* genomes identify novel antimicrobial drug targets. *Journal of bacteriology* 191(12), 4015–4024. 10.1128/JB.01743-08.
 36. Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L (2000) Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature biotechnology* 18(11), 1157–1161. 10.1038/81137.
 37. Raamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, Zhang N, Hayes A, Walsh MC, Berden JA, Brindle KM, Kell DB, Rowland JJ, Westerhoff HV, van Dam K, Oliver SG (2001) A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nature biotechnology* 19(1), 45–50. 10.1038/83496.
 38. Greenaway W, May J, Scaysbrook T, Whatley FR (1991) Identification by Gas Chromatography-Mass Spectrometry of 150 Compounds in Propolis. *Zeitschrift für Naturforschung C* 46(1-2), 111–121. 10.1515/znc-1991-1-218.
 39. van Eijk HM, Rooyackers DR, Soeters PB, Deutz NE (1999) Determination of amino acid isotope enrichment using liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical biochemistry* 271(1), 8–17. 10.1006/abio.1999.4112.
 40. Lindon JC, Nicholson JK, Everett JR (1999) NMR Spectroscopy of Biofluids, in: *Annual Reports on NMR Spectroscopy Volume 38*, pp. 1–88: Elsevier.

41. Aretz I, Meierhofer D (2016) Advantages and Pitfalls of Mass Spectrometry Based Metabolome Profiling in Systems Biology. *International journal of molecular sciences* 17(5), 10.3390/ijms17050632.
42. Dias DA, Koal T (2016) Progress in Metabolomics Standardisation and its Significance in Future Clinical Laboratory Medicine. *EJIFCC* 27(4), 331–343.
43. Shulaev V (2006) Metabolomics technology and bioinformatics. *Briefings in bioinformatics* 7(2), 128–139. 10.1093/bib/bbl012.
44. Simmler C, Napolitano JG, McAlpine JB, Chen S-N, Pauli GF (2014) Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. *Current opinion in biotechnology* 25, 51–59. 10.1016/j.copbio.2013.08.004.
45. Babushok VI, Linstrom PJ, Reed JJ, Zenkevich IG, Brown RL, Mallard WG, Stein SE (2007) Development of a database of gas chromatographic retention properties of organic compounds. *Journal of chromatography. A* 1157(1-2), 414–421. 10.1016/j.chroma.2007.05.044.
46. Horai H, Arita M, Kanaya S, Nihei Y, Ikeda T, Suwa K, Ojima Y, Tanaka K, Tanaka S, Aoshima K, Oda Y, Kakazu Y, Kusano M, Tohge T, Matsuda F, Sawada Y, Hirai MY, Nakanishi H, Ikeda K, Akimoto N, Maoka T, Takahashi H, Ara T, Sakurai N, Suzuki H, Shibata D, Neumann S, Iida T, Tanaka K, Funatsu K, Matsuura F, Soga T, Taguchi R, Saito K, Nishioka T (2010) MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *Journal of mass spectrometry JMS* 45(7), 703–714. 10.1002/jms.1777.
47. Kopka J, Schauer N, Krueger S, Birkemeyer C, Usadel B, Bergmüller E, Dörmann P, Weckwerth W, Gibon Y, Stitt M, Willmitzer L, Fernie AR, Steinhauser D (2005) GMD@CSB.DB: The Golm Metabolome Database. *Bioinformatics (Oxford, England)* 21(8), 1635–1638. 10.1093/bioinformatics/bti236.
48. Koal T, Deigner H-P (2010) Challenges in mass spectrometry based targeted metabolomics. *Current molecular medicine* 10(2), 216–226.
49. Wishart DS (2016) Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nature reviews. Drug discovery* 15(7), 473–484. 10.1038/nrd.2016.32.
50. Ryan D, Robards K (2006) Metabolomics: The greatest omics of them all? *Analytical chemistry* 78(23), 7954–7958. 10.1021/ac0614341.
51. Jacob M, Lopata AL, Dasouki M, Abdel Rahman AM (2017) Metabolomics toward personalized medicine. *Mass spectrometry reviews*. 10.1002/mas.21548.
52. Somerville GA, Proctor RA (2013) Cultivation conditions and the diffusion of oxygen into culture media: The rationale for the flask-to-medium ratio in microbiology. *BMC microbiology* 13, 9. 10.1186/1471-2180-13-9.
53. Atkinson DE (1968) Energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7(11), 4030–4034. 10.1021/bi00851a033.
54. Chapman AG, Fall L, Atkinson DE (1971) Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *Journal of bacteriology* 108(3), 1072–1086.
55. Nelson AL, Roche AM, Gould JM, Chim K, Ratner AJ, Weiser JN (2007) Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infection and immunity* 75(1), 83–90. 10.1128/IAI.01475-06.

56. King SJ, Hippe KR, Weiser JN (2006) Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology* 59(3), 961–974. 10.1111/j.1365-2958.2005.04984.x.
57. Burnaugh AM, Frantz LJ, King SJ (2008) Growth of *Streptococcus pneumoniae* on human glycoconjugates is dependent upon the sequential activity of bacterial exoglycosidases. *Journal of bacteriology* 190(1), 221–230. 10.1128/JB.01251-07.
58. Rose MC, Voynow JA (2006) Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. *Physiological reviews* 86(1), 245–278. 10.1152/physrev.00010.2005.
59. Rigden DJ, Galperin MY, Jedrzejewski MJ (2003) Analysis of structure and function of putative surface-exposed proteins encoded in the *Streptococcus pneumoniae* genome: A bioinformatics-based approach to vaccine and drug design. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 38(2), 143–168. 10.1080/713609215.
60. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF (2009) *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiology and molecular biology reviews MMBR* 73(3), 407–50, Table of Contents. 10.1128/MMBR.00014-09.
61. O'Toole RD, Goode L, Howe C (1971) Neuraminidase activity in bacterial meningitis. *The Journal of clinical investigation* 50(5), 979–985. 10.1172/JCI106591.
62. Yesilkaya H, Spissu F, Carvalho SM, Terra VS, Homer KA, Benisty R, Porat N, Neves AR, Andrew PW (2009) Pyruvate formate lyase is required for pneumococcal fermentative metabolism and virulence. *Infection and immunity* 77(12), 5418–5427. 10.1128/IAI.00178-09.
63. King SJ, Whatmore AM, Dowson CG (2005) NanA, a neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae*, shows high levels of sequence diversity, at least in part through recombination with *Streptococcus oralis*. *Journal of bacteriology* 187(15), 5376–5386. 10.1128/JB.187.15.5376-5386.2005.
64. Gualdi L, Hayre JK, Gerlini A, Bidossi A, Colomba L, Trappetti C, Pozzi G, Docquier J-D, Andrew P, Ricci S, Oggioni MR (2012) Regulation of neuraminidase expression in *Streptococcus pneumoniae*. *BMC microbiology* 12, 200. 10.1186/1471-2180-12-200.
65. Li-Korotky H-S, Lo C-Y, Banks JM (2010) Interaction of pneumococcal phase variation, host and pressure/gas composition: Virulence expression of NanA, HlyA, PspA and CbpA in simulated otitis media. *Microbial pathogenesis* 49(4), 204–210. 10.1016/j.micpath.2010.05.014.
66. KREBS HA (1950) Chemical composition of blood plasma and serum. *Annual review of biochemistry* 19, 409–430. 10.1146/annurev.bi.19.070150.002205.
67. Brouwer MC, Tunkel AR, van de Beek D (2010) Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. *Clinical microbiology reviews* 23(3), 467–492. 10.1128/CMR.00070-09.
68. Saunders NR, Daneman R, Dziegielewska KM, Liddelow SA (2013) Transporters of the blood-brain and blood-CSF interfaces in development and in the adult. *Molecular aspects of medicine* 34(2-3), 742–752. 10.1016/j.mam.2012.11.006.
69. Leonard A, Gierok P, Methling K, Gómez-Mejía A, Hammerschmidt S, Lalk M (2018) Metabolic inventory of *Streptococcus pneumoniae* growing in a chemical defined environment. *International Journal of Medical Microbiology*. 10.1016/j.ijmm.2018.01.001.

70. Hoskins J, Alborn WE, Arnold J, Blaszcak LC, Burgett S, DeHoff BS, Estrem ST, Fritz L, Fu DJ, Fuller W, Geringer C, Gilmour R, Glass JS, Khoja H, Kraft AR, Lagace RE, LeBlanc DJ, Lee LN, Lefkowitz EJ, Lu J, Matsushima P, McAhren SM, McHenney M, McLeaster K, Mundy CW, Nicas TI, Norris FH, O'Gara M, Peery RB, Robertson GT, Rockey P, Sun PM, Winkler ME, Yang Y, Young-Bellido M, Zhao G, Zook CA, Baltz RH, Jaskunas SR, Rosteck PR, Skatrud PL, Glass JI (2001) Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *Journal of bacteriology* 183(19), 5709–5717. 10.1128/JB.183.19.5709-5717.2001.
71. Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Peterson S, Heidelberg J, DeBoy RT, Haft DH, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn M, Kolonay JF, Nelson WC, Peterson JD, Umayam LA, White O, Salzberg SL, Lewis MR, Radune D, Holtzapple E, Khouri H, Wolf AM, Utterback TR, Hansen CL, McDonald LA, Feldblyum TV, Angiuoli S, Dickinson T, Hickey EK, Holt IE, Loftus BJ, Yang F, Smith HO, Venter JC, Dougherty BA, Morrison DA, Hollingshead SK, Fraser CM (2001) Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science (New York, N.Y.)* 293(5529), 498–506. 10.1126/science.1061217.
72. Kundig W, Ghosh S, Roseman S (1964) Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phospho-transferase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 52, 1067–1074.
73. Scott DB, Cohen SS (1953) The oxidative pathway of carbohydrate metabolism in *Escherichia coli*. 1. The isolation and properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase. *The Biochemical journal* 55(1), 23–33.
74. Carvalho SM, Kloosterman TG, Kuipers OP, Neves AR (2011) CcpA ensures optimal metabolic fitness of *Streptococcus pneumoniae*. *PloS one* 6(10), e26707. 10.1371/journal.pone.0026707.
75. Bergmann S, Hammerschmidt S (2006) Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology (Reading, England)* 152(Pt 2), 295–303. 10.1099/mic.0.28610-0.
76. Schulz C, Hammerschmidt S (2013) Exploitation of physiology and metabolomics to identify pneumococcal vaccine candidates. *Expert review of vaccines* 12(9), 1061–1075. 10.1586/14760584.2013.824708.
77. Neijssel OM, Snoep JL, Teixeira de Mattos MJ (1997) Regulation of energy source metabolism in streptococci. *Journal of Applied Microbiology* 83(S1), 12–19. 10.1046/j.1365-2672.83.s1.2.x.
78. Fuchs TM, Eisenreich W, Heesemann J, Goebel W (2012) Metabolic adaptation of human pathogenic and related nonpathogenic bacteria to extra- and intracellular habitats. *FEMS microbiology reviews* 36(2), 435–462. 10.1111/j.1574-6976.2011.00301.x.
79. Reitzer L (2003) Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annual review of microbiology* 57, 155–176. 10.1146/annurev.micro.57.030502.090820.
80. Härtel T, Eylert E, Schulz C, Petruschka L, Gierok P, Grubmüller S, Lalk M, Eisenreich W, Hammerschmidt S (2012) Characterization of central carbon metabolism of *Streptococcus pneumoniae* by isotopologue profiling. *The Journal of biological chemistry* 287(6), 4260–4274. 10.1074/jbc.M111.304311.
81. Basavanna S, Khandavilli S, Yuste J, Cohen JM, Hosie AH, Webb AJ, Thomas GH, Brown JS (2009) Screening of *Streptococcus pneumoniae* ABC transporter mutants demonstrates that

- LivJHMGF, a branched-chain amino acid ABC transporter, is necessary for disease pathogenesis. *Infection and immunity* 77(8), 3412–3423. 10.1128/IAI.01543-08.
82. Fischer H, Tomasz A (1985) Peptidoglycan cross-linking and teichoic acid attachment in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology* 163(1), 46–54.
83. Goff RC, Hartman RE (1970) Carbon dioxide fixation by cells of *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*. *Journal of bacteriology* 104(1), 27–33.
84. Hartman RE (1970) Carbon dioxide fixation by extracts of *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens*. *Journal of bacteriology* 102(2), 341–346.
85. Lachica VF, Hartman PA (1969) Inhibition of CO₂ fixation in group D streptococci. *Can. J. Microbiol.* 15(1), 57–60. 10.1139/m69-009.
86. Eisenreich W, Slaghuis J, Laupitz R, Bussemer J, Stritzker J, Schwarz C, Schwarz R, Dandekar T, Goebel W, Bacher A (2006) ¹³C isotopologue perturbation studies of *Listeria monocytogenes* carbon metabolism and its modulation by the virulence regulator PrfA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(7), 2040–2045. 10.1073/pnas.0507580103.
87. Herrmann KM, Weaver LM (1999) THE SHIKIMATE PATHWAY. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 50, 473–503. 10.1146/annurev.arplant.50.1.473.
88. Eylert E, Schär J, Mertins S, Stoll R, Bacher A, Goebel W, Eisenreich W (2008) Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages. *Molecular microbiology* 69(4), 1008–1017. 10.1111/j.1365-2958.2008.06337.x.
89. Gutierrez ML, Garrabou X, Agosta E, Servi S, Parella T, Joglar J, Clapés P (2008) Serine hydroxymethyl transferase from *Streptococcus thermophilus* and L-threonine aldolase from *Escherichia coli* as stereocomplementary biocatalysts for the synthesis of beta-hydroxy-alpha,omega-diamino acid derivatives. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 14(15), 4647–4656. 10.1002/chem.200800031.
90. Vidal L, Calveras J, Clapés P, Ferrer P, Caminal G (2005) Recombinant production of serine hydroxymethyl transferase from *Streptococcus thermophilus* and its preliminary evaluation as a biocatalyst. *Applied microbiology and biotechnology* 68(4), 489–497. 10.1007/s00253-005-1934-1.
91. Brosnan JT (2003) Interorgan amino acid transport and its regulation. *The Journal of nutrition* 133(6 Suppl 1), 2068S–2072S. 10.1093/jn/133.6.2068S.
92. Kloosterman TG, Kuipers OP (2011) Regulation of arginine acquisition and virulence gene expression in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae* by transcription regulators ArgR1 and AhrC. *The Journal of biological chemistry* 286(52), 44594–44605. 10.1074/jbc.M111.295832.
93. Piet JR, Geldhoff M, van Schaik BDC, Brouwer MC, Valls Seron M, Jakobs ME, Schipper K, Pannekoek Y, Zwinderman AH, van der Poll T, van Kampen AHC, Baas F, van der Ende A, van de Beek D (2014) *Streptococcus pneumoniae* arginine synthesis genes promote growth and virulence in pneumococcal meningitis. *The Journal of infectious diseases* 209(11), 1781–1791. 10.1093/infdis/jit818.
94. Schulz C, Gierok P, Petruschka L, Lalk M, Mäder U, Hammerschmidt S (2014) Regulation of the arginine deiminase system by ArgR2 interferes with arginine metabolism and fitness of *Streptococcus pneumoniae*. *mBio* 5(6). 10.1128/mBio.01858-14.

95. Gupta R, Yang J, Dong Y, Swiatlo E, Zhang J-R, Metzger DW, Bai G (2013) Deletion of *arcD* in *Streptococcus pneumoniae* D39 impairs its capsule and attenuates virulence. *Infection and immunity* 81(10), 3903–3911. 10.1128/IAI.00778-13.
96. Guillot A, Gitton C, Anglade P, Mistou M-Y (2003) Proteomic analysis of *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacterium. *Proteomics* 3(3), 337–354. 10.1002/pmic.200390047.
97. Wadskov-Hansen SL, Martinussen J, Hammer K (2000) The *pyrH* gene of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* encoding UMP kinase is transcribed as part of an operon including the *frr1* gene encoding ribosomal recycling factor 1. *Gene* 241(1), 157–166.
98. Mosser JL, Tomasz A (1970) Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *The Journal of biological chemistry* 245(2), 287–298.
99. Fischer W (2000) Phosphocholine of pneumococcal teichoic acids: Role in bacterial physiology and pneumococcal infection. *Research in microbiology* 151(6), 421–427.
100. Geelen S, Bhattacharyya C, Tuomanen E (1993) The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. *Infection and immunity* 61(4), 1538–1543.
101. Delcour J, Ferain T, Deghorain M, Palumbo E, Hols P (1999) The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76(1-4), 159–184.
102. Xu H, Wang L, Huang J, Zhang Y, Ma F, Wang J, Xu W, Zhang X, Yin Y, Wu K (2015) Pneumococcal wall teichoic acid is required for the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* in murine models. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 53(2), 147–154. 10.1007/s12275-015-4616-4.
103. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T (2008) Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS microbiology reviews* 32(2), 361–385. 10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x.
104. Typas A, Banzhaf M, Gross CA, Vollmer W (2011) From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature reviews. Microbiology* 10(2), 123–136. 10.1038/nrmicro2677.
105. Vollmer W, Blanot D, Pedro MA de (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS microbiology reviews* 32(2), 149–167. 10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x.
106. Sham L-T, Tsui H-CT, Land AD, Barendt SM, Winkler ME (2012) Recent advances in pneumococcal peptidoglycan biosynthesis suggest new vaccine and antimicrobial targets. *Current opinion in microbiology* 15(2), 194–203. 10.1016/j.mib.2011.12.013.
107. El Moujabber G, Osman M, Rafei R, Dabboussi F, Hamze M (2017) Molecular mechanisms and epidemiology of resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the Middle East region. *Journal of medical microbiology* 66(7), 847–858. 10.1099/jmm.0.000503.
108. Leonard A, Lalk M (2018) Infection and metabolism - *Streptococcus pneumoniae* metabolism facing the host environment. *Cytokine* 112, 75–86. 10.1016/j.cyto.2018.07.021.
109. Leonard A, Möhlis K, Schlüter R, Taylor E, Lalk M, Karen M Exploring metabolic adaptation of *Streptococcus pneumoniae* to antibiotics. *The Journal of Antibiotics* (submitted)
110. Todd PA, Brogden RN (1990) Cefotaxime. An update of its pharmacology and therapeutic use. *Drugs* 40(4), 608–651. 10.2165/00003495-199040040-00008.

111. Hakenbeck R, Ellerbrok H, Briese T, Handwerger S, Tomasz A (1986) Penicillin-binding proteins of penicillin-susceptible and -resistant pneumococci: Immunological relatedness of altered proteins and changes in peptides carrying the beta-lactam binding site. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 30(4), 553–558.
112. Carmine AA, Brogden RN, Heel RC, Speight TM, Avery GS (1983) Cefotaxime. A review of its antibacterial activity, pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs* 25(3), 223–289. 10.2165/00003495-198325030-00001.
113. Lee CE, Zembower TR, Fotis MA, Postelnick MJ, Greenberger PA, Peterson LR, Noskin GA (2000) The incidence of antimicrobial allergies in hospitalized patients: Implications regarding prescribing patterns and emerging bacterial resistance. *Archives of internal medicine* 160(18), 2819–2822.
114. Lee SH, Jarantow LW, Wang H, Sillaots S, Cheng H, Meredith TC, Thompson J, Roemer T (2011) Antagonism of chemical genetic interaction networks resensitize MRSA to β -lactam antibiotics. *Chemistry & biology* 18(11), 1379–1389. 10.1016/j.chembiol.2011.08.015.
115. Zitka O, Skalickova S, Gumulec J, Masarik M, Adam V, Hubalek J, Trnkova L, Kruseova J, Eckschlager T, Kizek R (2012) Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology letters* 4(6), 1247–1253. 10.3892/ol.2012.931.
116. Langtry HD, Balfour JA (1998) Azithromycin. A review of its use in paediatric infectious diseases. *Drugs* 56(2), 273–297. 10.2165/00003495-199856020-00014.
117. Bailly S, Pocidalo JJ, Fay M, Gougerot-Pocidalo MA (1991) Differential modulation of cytokine production by macrolides: Interleukin-6 production is increased by spiramycin and erythromycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 35(10), 2016–2019.
118. Lieberman D, Schlaeffer F, Boldur I, Horowitz S, Friedman MG, Leiononen M, Horovitz O, Manor E, Porath A (1996) Multiple pathogens in adult patients admitted with community-acquired pneumonia: A one year prospective study of 346 consecutive patients. *Thorax* 51(2), 179–184.
119. Culić O, Eraković V, Cepelak I, Barisić K, Brajsa K, Ferencić Z, Galović R, Glojnaric I, Manojlović Z, Munić V, Novak-Mircetić R, Pavicić-Beljask V, Sucić M, Veljaca M, Zanić-Grubisić T, Parnham MJ (2002) Azithromycin modulates neutrophil function and circulating inflammatory mediators in healthy human subjects. *European journal of pharmacology* 450(3), 277–289.
120. Kaul R, McGeer A, Norrby-Teglund A, Kotb M, Schwartz B, O'Rourke K, Talbot J, Low DE (1999) Intravenous immunoglobulin therapy for streptococcal toxic shock syndrome--a comparative observational study. The Canadian Streptococcal Study Group. *Clinical infectious diseases an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 28(4), 800–807. 10.1086/515199.
121. Kanoh S, Rubin BK (2010) Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clinical microbiology reviews* 23(3), 590–615. 10.1128/CMR.00078-09.
122. Dörries K, Schlueter R, Lalk M (2014) Impact of antibiotics with various target sites on the metabolome of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58(12), 7151–7163. 10.1128/AAC.03104-14.

123. Schroeder MR, Stephens DS (2016) Macrolide Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 6, 98. 10.3389/fcimb.2016.00098.
124. Ambrose KD, Nisbet R, Stephens DS (2005) Macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae* is mediated by a dual efflux pump (mel and mef) and is erythromycin inducible. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49(10), 4203–4209. 10.1128/AAC.49.10.4203-4209.2005.
125. Zimmermann GS, Neurohr C, Villena-Hermoza H, Hatz R, Behr J (2009) Anti-inflammatory effects of antibacterials on human Bronchial epithelial cells. *Respiratory research* 10, 89. 10.1186/1465-9921-10-89.
126. Donnarumma G, Paoletti I, Buommino E, Iovene MR, Tudisco L, Cozza V, Tufano MA (2007) Anti-inflammatory effects of moxifloxacin and human beta-defensin 2 association in human lung epithelial cell line (A549) stimulated with lipopolysaccharide. *Peptides* 28(12), 2286–2292. 10.1016/j.peptides.2007.09.009.
127. Choi J-H, Song M-J, Kim S-H, Choi S-M, Lee D-G, Yoo J-H, Shin W-S (2003) Effect of moxifloxacin on production of proinflammatory cytokines from human peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47(12), 3704–3707.
128. Araujo FG, Slifer TL, Remington JS (2002) Effect of moxifloxacin on secretion of cytokines by human monocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Clinical microbiology and infection the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 8(1), 26–30.
129. Ewig S, Hecker H, Suttrop N, Marre R, Welte T (2011) Moxifloxacin monotherapy versus β -lactam mono- or combination therapy in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *The Journal of infection* 62(3), 218–225. 10.1016/j.jinf.2011.01.009.
130. Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR (2003) Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *The Lancet. Infectious diseases* 3(7), 432–442.
131. Caeiro J-P, Iannini PB (2003) Moxifloxacin (Avelox): A novel fluoroquinolone with a broad spectrum of activity. *Expert review of anti-infective therapy* 1(3), 363–370.
132. Higgins ML, Daneo-Moore L, Boothby D, Shockman GD (1974) Effect of inhibition of deoxyribonucleic acid and protein synthesis on the direction of cell wall growth in *Streptococcus faecalis*. *Journal of bacteriology* 118(2), 681–692.
133. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Abt. Pharmakovigilanz (2019) Fluorchinolone –langanhaltende und beeinträchtigende Nebenwirkungen im Bereich Muskeln, Gelenke und Nervensystem.
134. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV (2015) Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews. Microbiology* 13(1), 42–51. 10.1038/nrmicro3380.
135. Clatworthy AE, Pierson E, Hung DT (2007) Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature chemical biology* 3(9), 541–548. 10.1038/nchembio.2007.24.
136. Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, Mueller A, Schaberle TF, Hughes DE, Epstein S, Jones M, Lazarides L, Steadman VA, Cohen DR, Felix CR, Fetterman KA, Millett WP, Nitti AG, Zullo AM, Chen C, Lewis K (2015) A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* 517(7535), 455–459. 10.1038/nature14098.

137. Parmar A, Iyer A, Lloyd DG, Vincent CS, Prior SH, Madder A, Taylor EJ, Singh I (2017) Syntheses of potent teixobactin analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) through the replacement of l-allo-enduracididine with its isosteres. *Chemical communications* (Cambridge, England) 53(55), 7788–7791. 10.1039/c7cc04021k.
138. Homma T, Nuxoll A, Gandt AB, Ebner P, Engels I, Schneider T, Götz F, Lewis K, Conlon BP (2016) Dual Targeting of Cell Wall Precursors by Teixobactin Leads to Cell Lysis. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 60(11), 6510–6517. 10.1128/AAC.01050-16.

Artikel I

Infection and metabolism – *Streptococcus pneumoniae* metabolism
facing the host environment

Anne Leonard, Michael Lalk

Cytokine

Volume 112, December 2018, Pages 75-86

Veröffentlicht: 1. August 2018

DOI: 10.1016/j.cyto.2018.07.021

Author's contributions

Conceived the manuscript: **AL** and ML. Wrote the manuscript and provided figures:
AL. Provided editorial advice: ML.

Anne Leonard

Michael Lalk



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytokine

Infection and metabolism – *Streptococcus pneumoniae* metabolism facing the host environment



A. Leonard, M. Lalk*

University of Greifswald, Institute for Biochemistry, Felix-Hausdorff-Str. 4, 17487 Greifswald, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Streptococcus pneumoniae
Metabolism
Glycolysis
Energy metabolism
Infection

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae, a Gram-positive bacterium, can cause a broad range of severe diseases including pneumonia, septicemia and meningitis. The pneumococcal pathophysiology is highly dependent on host nutrients such as purines, pyrimidines, amino acids and carbon sources. The study of *S. pneumoniae* metabolism is essential for understanding the adaption strategies that are required to deal with the host environment during infection and to identify possible new drug targets. By using a combination of high analytical techniques, such as nuclear magnetic resonance (NMR), liquid chromatography (LC) and/or gas chromatography (GC) coupled with mass spectroscopy (MS) the metabolism of *S. pneumoniae* can be precisely investigated. This review summarizes the metabolism and major virulence factors of *S. pneumoniae* within the context of infection. Furthermore, it addresses the antibiotic resistance and its influence on metabolism as well as new antimicrobial substances for the treatment of *S. pneumoniae*.

1. Introduction

Thousand microbes reach the nasopharyngeal zone daily via the air. Also following food uptake, various microbes enter mouth and gastrointestinal tract. Humans and animals can live in coexistence with bacteria due to effective host defense mechanisms. *Streptococcus pneumoniae*, the pneumococcus, is a typically harmless colonizer of the human nasopharyngeal epithelium. In general, pneumococcal colonization occurs asymptotically. However, these bacteria can become pathogenic and cause diseases usually by resisting the host defenses and growing at the expense of the host. *S. pneumoniae*, an obligate human pathogen, is a small (1 µm) Gram-positive bacterium with a slightly elongated coccoidal shape. In addition, *S. pneumoniae* occurs in pairs, which are encapsulated and nonmotile. The pneumococcus is a fermentative aerotolerant microbe, which is under laboratory conditions usually cultured in complex media or in media containing blood. On blood agar plates, colonies characteristically produce a zone of α-hemolysis. *In vivo*, *S. pneumoniae* is a common inhabitant of the upper respiratory tract of humans [1]. After colonizing the mucosal surfaces of the host, *S. pneumoniae* can trigger serious diseases such as otitis media, sinusitis, pneumonia, septicemia, and meningitis [2]. Annually, due to invasive infections with *S. pneumoniae* connected to high rates of mortality and morbidity (worldwide 1.5 million) among children under the age of five, elderly persons and immunosuppressed patients [3–6].

Pneumococcal pneumonia is the most common from pneumococcal disease in adults. About 900,000 Americans get pneumococcal pneumonia each year [7]. The annual number of fatal pneumococcal infections was estimated to reach 40,000 (around 5–7%) [7,8]. In 2000, pneumococcal disease caused about 826,000 deaths in children aged 1–59 months, of which 91,000 children were HIV-positive and 735,000 HIV-negative children [3]. Over 61% of the deaths in HIV-negative children occurred in ten countries of African and Asian [3]. These numbers demonstrate need for more in-depth understanding of pneumococcal infection mechanism [9]. The high-risk categories include children under age of five and elderly. One important challenge in treating *S. pneumoniae* infections is its increasing drug resistance over the past decades. Currently, 15–30% of the strains are classified as multi drug resistant [10]. Traditional therapy of pneumococcal pneumonia has included β-lactam, macrolide and tetracycline antibiotics (see Table 1) [11]. The emergence of antimicrobial resistance in bacterial infections has become a major public health concern worldwide, during the last decades [12]. *S. pneumoniae* is increasingly resistant to the most common clinically used drugs such as β-lactam antibiotics and macrolides [13]. To ensure successful treatments in the future there is an urgent need for new antimicrobial drugs against *S. pneumoniae* and their resistant strains. Vaccine coverage is limited and replacement by non-vaccine serotypes resulting in disease is a serious threat for the near future. The current 13-valent conjugate vaccine is highly effective

* Corresponding author.

E-mail address: lalk@uni-greifswald.de (M. Lalk).<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.07.021>

Received 12 April 2018; Received in revised form 15 July 2018; Accepted 16 July 2018

Available online 01 August 2018

1043-4666/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1

Antibiotic treatment of pneumococcal pneumonia [11]. The macrolide treatment should be discontinued after three days, if no atypical bacterial pathogens have been detected.

	Slight pneumonia	Slight pneumonia	Moderate pneumonia		Serious pneumonia	
Comorbidity	–	+	+		+	
Primal therapy	Amoxicillin	Amoxicillin/ Clavulanic acid	Amoxicillin/ Clavulanic acid	+ / – Macrolide	Piperacillin/ Tazobactam	+ / – Macrolide
			Amoxicillin/ Sulbactam	+ / – Macrolide	Ceftriaxon	
			Cefuroxime	+ / – Macrolide	Cefotaxim	
			Ceftriaxone	+ / – Macrolide		
			Cefotaxime	+ / – Macrolide		
Alternative therapy	Moxifloxacin, levofloxacin, clarithromycin, azithromycin, doxycycline	Moxifloxacin, levofloxacin	Moxifloxacin, levofloxacin		Moxifloxacin, levofloxacin	

against invasive diseases caused by the vaccine-type strains [14]. The goal of pneumococcal vaccination is to stimulate effective antibody, mucosal immunity and immunological memory. Thus, a current challenge is the identification of new vaccine candidates that elicit protection against a broader range of pneumococcal strains and enable to develop a serotype-independent vaccine. The environment plays a crucial role by affecting the metabolism and the virulence of *S. pneumoniae* [15–18]. Hence, the bacteria have to adapt to the specific host compartments they have encountered. For *Staphylococcus aureus* it has been reported that virulence determinants such as capsular polysaccharides or toxins are negatively regulated in nutrient-rich environments, whereas adhesins are positively regulated [19]. The specific metabolic adaptation mechanisms to stress encountered in the host cells enable *S. pneumoniae* to outcompete other bacteria and survive in hostile host environments. In addition to nutrient limitations, surpassing mineral limitation is another obstacle for pneumococcal surviving [15]. However, the ability of *S. pneumoniae* to adapt its metabolism in a hostile host environment and in a depleted ion concentration medium is essential for its survival and spreading. In this review, we summarize the current knowledge about *S. pneumoniae* metabolism in the context of host-derived metabolism, emphasizing on the virulence factors and the metabolic adaption during antibiotic resistance.

2. Metabolic epithelial host cells response

Pneumococcal carriage and infection is a highly regulated interplay between pathogen and host-specific factors and the contact of *S. pneumoniae* with the surface of the host. Epithelial cell lines, like 16HBE14o[–] (surface of airway epithelia), S9 (lower layer of the bronchial epithelium) [20–22] and two different breast cancer cell lines, MCF7 and MDA-MB-231 cells show distinct metabolic host cell responses upon stimulation by soy isoflavones indicative of the host cell specific responses [23]. The cells S9 and 16HBE14o[–] showed largely similar metabolic profiles with a comparable adenylate energy charge [24]. Metabolic profiles of MCF7 and MDA-MB-231 cells are also comparable [23,24]. The most consumed metabolites were glucose and glutamine, as main carbon and nitrogen sources. The Warburg effect, generation of lactate by cancer cells in presence of oxygen and production of energy via glycolysis and lactate fermentation, has also been proven for fast proliferating cells and cell lines [21,24–30]. An additional energy source was pyruvate [23]. Due to the increased aerobic glycolysis to cancerous cells, glucose and pyruvate are converted to lactate [23]. In S9 and 16HBE14o[–] cells, glutamine, myo-inositol, glucose, glutamate and ATP were identified as the most abundant intracellular metabolites [24]. A study from Gierok et al. identified also amino acid like serine, threonine and asparagine as high metabolites

one hour after fresh medium was supplied in the cells under standard culture conditions [24].

3. Metabolism of *Streptococcus pneumoniae*

Metabolism is a term used to describe all biochemical reactions involved in the living state of cells and organisms. The study of bacterial metabolism focuses on the chemical diversity of substrate oxidations and dissimilation reactions, uptake and release of inorganic or organic compounds, which normally occur in order to generate energy. So far, the current knowledge of pneumococcal metabolism and biochemical characteristics is based on incomplete data sets (see Fig. 1). Understanding the metabolism of pathogens is essential to gain insights regarding the adaptation strategies that are required to deal with the host environment during infection and to identify new drug targets.

In order to adapt to different physiological conditions, *S. pneumoniae* has a large number of enzymes and transporter systems involved in the uptake of carbohydrates, amino acids and other compounds. Thirty percent of the pneumococcal transporter systems (ATP-binding cassette (ABC) transporters and phosphotransferase systems) are involved in the uptake of approximately 12 different carbohydrates, which can be metabolized via glycolysis (namely, the Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway) or pentose phosphate pathway (PPP) [31–33]. One of the least explored topics of pneumococcal biology is how the pathogen is able to generate its metabolic energy. As *S. pneumoniae* is a fermentative bacterium, sugars are the major energy source for biosynthesis and growth [31,33]. Thus, the survival and the growth of *S. pneumoniae* are conditioned by its metabolic status [34,35]. The global nutritional regulation such as CodY and catabolite control protein A (CcpA) regulate the metabolism of *S. pneumoniae*. Recently a metabolomics workflow with an intracellular sampling protocol for studies on the pathophysiology of *S. pneumoniae* was shown [36].

3.1. Carbon metabolism

3.1.1. Glycolysis

Sugars are the major sources of energy for biosynthesis and growth [31,33]. Glycolysis is the catabolic pathway that generates two molecules of pyruvate per molecule of glucose and reduces two molecules of NAD⁺, finally producing two ATP molecules. Glycolysis also generates several intermediates such as glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate, dihydroxyacetone phosphate, glyceraldehyde-3-phosphate, phosphoenolpyruvate (PEP), pyruvate and acetyl-CoA [37]. The enzymes involved in glycolysis are: glucokinase (SP_0668); glucose-6-phosphate isomerase (SP_2070); 6-phosphofructosokinase (SP_0896); fructose-bisphosphate aldolase (SP_0605); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (SP_2012); phosphoglycerate kinase (SP_0499); NADP-

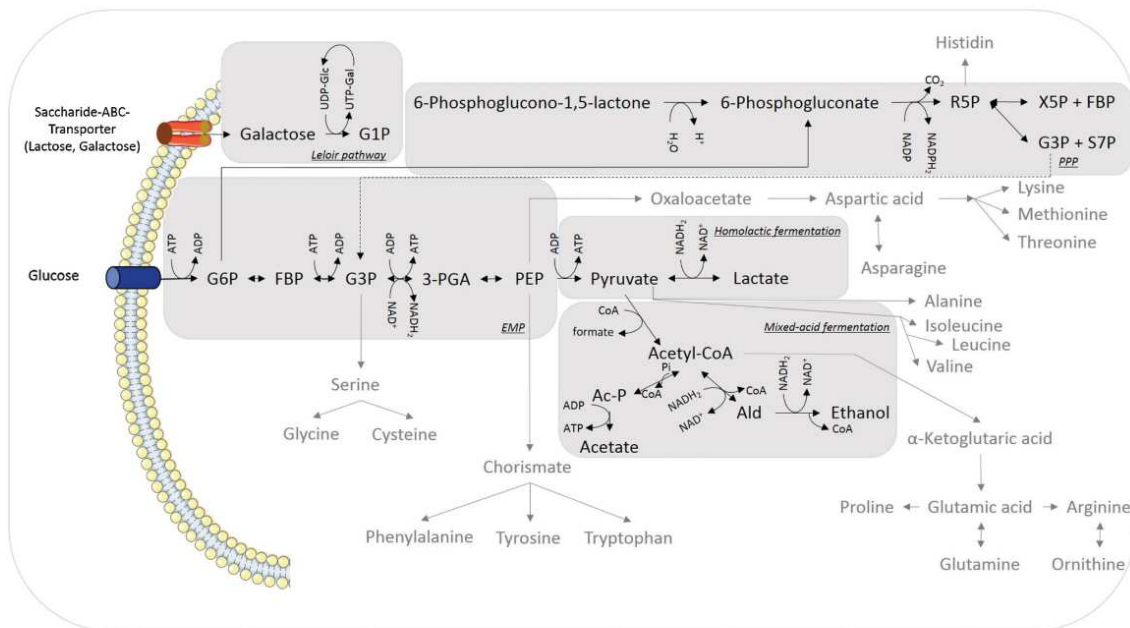


Fig. 1. Carbon and amino acid metabolism of *Streptococcus pneumoniae*. The metabolic pathways are highlighted with a dark grey background (Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway (glycolysis), Pentose phosphate pathway (PPP), Leloir pathway, Homolactic and mixed acid fermentation). Glucose is oxidized to pyruvate via the EMP. Pyruvate reduce to lactate via the Homolactic fermentation, whereas mixed-acid fermentation leads to acetate, formate and ethanol. Galactose is converted to G1P by the Leloir pathway. Amino acids are represent in grey. The Figure was created with help from <http://smart.servier.com/>. ABC-Transporter, ATP-binding cassette type transporter; UDP-Glc, Uridine diphosphate glucose; UTP-Gal, uridine triphosphate galactose; G1P, glucose-1-phosphate; R5P, ribulose-5-phosphate; X5P, xylulose-5-phosphate; FBP, fructose-6-phosphate; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; S7P, sedoheptulose-7-phosphate; G6P, glucose-6-phosphate; 3-PGA, 3-phosphoglycerate; PPP, pentose phosphate pathway; Ac-P, acetyl-phosphate; Ald, acetaldehyde.

dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (SP_1119); phosphoglycerate mutase (SP_1655, SP_0240); enolase (SP_1128) and pyruvate kinase (SP_0897). The activation of these EMP enzymes is dependent on Mn^{2+} or Mg^{2+} cations. These cations are important co-factors that bind to negatively charged or energy-rich phosphorylated substrates of enzymes. The important step in generating energy is the PEP-dependent phosphotransferase system (PTS). This is a transport system used by the bacteria to bring sugar into the cytoplasm and using energy transferred from PEP [38,39]. *S. pneumoniae* uses two main pathways, EMP and PEP, in order to catabolize glucose and generate energy [18,36]. By the phosphoenolpyruvate (PEP)-dependent phosphotransferase (PTS), a glucose-specific IIA component, *S. pneumoniae* converts glucose and phosphorylates into glucose-6-phosphate [31]. From the mid-exponential phase to the transient growth phase, the concentration of glucose-6-phosphate is decreasing [36,40]. Subsequently, glucose-6-phosphate is converted into fructose-6-phosphate by glucose phosphate isomerase. In the next step of glycolysis, phosphofructokinase 1 converts fructose-6-phosphate in fructose-1,6-bisphosphate. The enzyme responsible for the cleavage of fructose-1,6-bisphosphate, the fructose-1,6-bisphosphate aldolase, was similar to the enolase, PGK and GAPDH identified on the cell surface of *S. pneumoniae* [41–44]. The highest amounts of intracellular fructose-1,6-bisphosphate were observed in *S. pneumoniae* TIGR4 and D39 strains [36,40]. The analysis of the ^{13}C -labeling patterns confirming the formation of triose phosphate and pyruvate via the EMP pathway [18]. These metabolic observations are supported by genomic studies as *S. pneumoniae* showed to express all the glycolytic genes [31,33].

3.1.2. Phosphoenolpyruvate (PEP)-dependent phosphotransferase system (PTS)

Streptococcus pneumoniae relied on glucose as the primary carbon

sources for survival and growth. As alternative energy sources, the bacteria is constrained to use non-glucose complex carbohydrates, using a salvage pathway. This pathway is used when glucose is present in insufficient amount. Carbon catabolite repression (CCR) is active when glucose is present in excess. CCR is regulated by the phosphoenolpyruvate (PEP)-dependent phosphotransferase (PTS) system [45,46]. This systems catalyzes the uptake, the phosphorylation, and the transport cascades of carbohydrates. In *S. pneumoniae* the PTS is absent in the laboratory strains D39 and TIGR4 [47–51], but was detected in four distinct serotype 3 isolates (Menzies 11 and Menzies 17 of ST458, and WCH206 and WCH207 of ST180) [52]. Despite the large number of sugar transporters in the pneumococcal, it has also been demonstrated that the removal of a single sugar utilization system can alter pneumococcal virulence [52]. Nevertheless, glucose and intermediates of the glycolysis were detected intracellularly in *S. pneumoniae* TIGR4 and D39 [18,36,40]. Hoskin et al. showed that glucose is taken up by the PTS and phosphorylated into glucose-6-phosphate [31].

3.1.3. Pentose phosphate pathway (Warburg-Lipmann-Dickens-Horecker Shunt)

The pentose phosphate pathway (PPP) produces three intermediates, ribose-5-phosphate, sedoheptulose-7-phosphate, and erythrose-4-phosphate [53]. The enzymes involved in the PPP pathway are transketolase (SP_1615) and ribulose-phosphate 3-epimerase (SP_1983). PPP also generates two molecules of NADH per molecule of glucose-6-phosphate, which can be used as electron donors [54].

3.1.4. Fermentation

S. pneumoniae is a member of Lactobacillales order and hence, lactate is their major catabolite produces by carbohydrate metabolism under microaerophilic conditions [31]. Moreover, *S. pneumoniae*

possesses a gene cluster (the *lac* gene cluster) encoding enzymes required for the functionality of tagatose and the Leloir pathway. The *lac* gene cluster consist of two operons, *lac* operon I and *lac* operon II. The whole cluster is regulated by two transcriptional regulators: LacR, which acts as a repressor for *lac* operon I in the presence of glucose (lactose utilization) and LacT, which activates *lac* operon II in the presence of lactose/galactose (lactose transport). The *lac* operon II encodes a lactose-dependent PTS, which is involved in the transport and the phosphorylation of lactose. In addition, the *lac* operon II also encodes 6-phospho- β -galactosidase (LacG), that breaks lactose-6-phosphate down into glucose and galactose-6-phosphate [55].

In the fermentation process, the lactate dehydrogenase converts pyruvate to lactate and regenerates NAD^+ [31,56]. Furthermore, the LDH represents an essential enzyme for the redox balance. The loss of LDH led to a dramatic reduction of bacterial growth rate, pointing the key role of this enzyme in the fermentative metabolism [57]. The metabolic shift from homolactic (lactate production) to mixed-acid fermentation, with the formation of other products than lactate (e.g., ethanol, acetate, and formate), is conditioned by certain conditions, such as aerobiosis, sugar limitation or the presence of other sugar sources, less capable of generating energy, such as galactose [18,36,40,58]. Mixed-acid fermentation is mediated by the activities of pyruvate dehydrogenase complex (PDHC) or pyruvate formate lyase (PFL) [56,59,60]. *In vitro*, *S. pneumoniae* displays a homofermentative behavior when high lactate concentrations are present [36,40]. *In vivo*, in patients with pneumococcal pneumonia, lactate, 3-hydroxybutyric acid and succinate were significantly higher [61,62]. The anaerobic metabolic pathway for glucose fermentation leads to protons release and carbon dioxide (CO_2) accumulation. This results in a low concentration of glucose in the pleural fluid glucose and an acid pH.

3.2. Amino acid metabolism

Amino acids can be important factors in the host-pathogen interaction. Among other amino acids, glutamate and glutamine play key roles in the bacterial metabolism. These amino acids serve as nitrogen donors in most biosynthetic processes [63]. To our knowledge, *S. pneumoniae* is an auxotrophic bacteria for arginine, cysteine, histidine, glycine, glutamine and branched chain amino acids (BCAA) like isoleucine, leucine, and valine [18]. In fact, BCAA are taken up by the ABC transporters LivJHMGF, as observed *in vitro* conditions [64]. In contrast, the lack of threonine, serine, asparagine, aspartate, alanine and lysine does not affect growth under *in vitro* conditions. *S. pneumoniae* is able to synthesize alanine by transamination of pyruvate into alanine [18]. Polar amino acids such as threonine, serine and asparagine are non-essential for pneumococcal growth in the presence of glucose as carbon source. In contrast, glutamine is essential for bacteria, regardless the glucose concentration [18,65]. During growth, glutamine is highly consumed and represents, most likely, the main source of organic nitrogen needed in the biosynthetic processes of *S. pneumoniae* [18,36,63]. In Gram-positive bacteria, glutamine is synthesized by the condensation of glutamate and NH_3 by glutamine synthetase, using ATP as catalyst [63]. *S. pneumoniae* produces at least 6 different glutamine uptake systems, and the most important is regulated by GlnR and the glutamine synthetase GlnA [18,66]. Although aspartate and lysine are nonessential for *S. pneumoniae* growth [18] the extracellular concentration of lysine is decreasing [36] and lysine can be used for peptidoglycan biosynthesis [67]. The intracellular concentration of aspartate is also increasing. This amino acid is an intermediate in urea cycle participates in gluconeogenesis and can facilitate aspartate biosynthesis [36]. While arginine and histidine are absolutely required for growth, the absence of glutamic acid only reduces pneumococcal fitness [18]. In contrast, in *L. monocytogenes* the glutamic acid is nonessential and is synthesized from α -ketoglutarate, which is formed via condensation of oxaloacetate and acetyl-CoA followed by decarboxylation. In *L. monocytogenes*, the oxaloacetate is formed following a complete TCA [68].

For *S. pneumoniae*, the concentration of arginine is decreasing concomitant with the increase of ornithine concentration, as observed by Schulz et al. [16,36]. The regulatory protein ArgR2 was shown to positively regulate the expression of arginine deiminase system (ADS) in *S. pneumoniae* TIGR4. Moreover, ArgR2 also regulates the arginine-ornithine antiporter ArcD, which was shown to be essential for arginine uptake from the extracellular environment and for TIGR4 virulence [16]. During inflammatory response, several immune cells such as the T cells, the B cells and the macrophages have also shown decreased arginine concentration [69–71]. In addition, arginine is a precursor for the biosynthesis of spermidine in *S. pneumoniae* [72,73]. *In vivo*, Piet et al. identified the pneumococcal arginine biosynthesis genes to be associated with outcome in patients with pneumococcal meningitis [72]. *S. pneumoniae* harboring these genes showed increasing resistance to oxidative stress and increased growth in human blood and cerebrospinal fluid. In accordance, in mouse models of pneumonia pneumococcal strains without arginine biosynthesis gene were attenuated in growth and cleared from lung, blood and cerebrospinal fluid [72].

While the lack of proline has a growth limiting effect, alanine is a nonessential amino acid for pneumococcal growth [18]. These two amino acids are secreted during growth [36]. Härtel et al. demonstrated by applying isotopologue profiling that aspartic acid is not synthesized via the general pathway, including pyruvate and acetyl-CoA. First, oxaloacetate is synthesized from PEP and CO_2 by PEP carboxylase. Next, oxaloacetate is converted into aspartate and finally, glutamate is converted into α -ketoglutarate. The pathway is similar to the PEP carboxylation observed in *Enterococcus faecalis* [74–76]. In part, the metabolic network is similar to the one found in *L. monocytogenes*, where oxaloacetate is also produced by carboxylation. Nevertheless, the carboxylation is performed by pyruvate and not PEP. In contrast to *S. pneumoniae* and *L. monocytogenes* does not produce a PEP carboxylase [77].

None of the aromatic amino acids are required for pneumococcal growth [18]. Clinical data show that patients with *S. pneumoniae* express higher levels of tryptophan, thymine, phenylalanine, leucine/isoleucine and threonine [61]. In general, the aromatic amino acids of microorganisms are synthesized via the shikimate pathway [78]. In the conventional pathway, PEP and erythrose-4-phosphate are the starting reactants, which generate in a series of metabolic steps the precursor chorismate. Phenylalanine and tyrosine label via the chorismate route from erythrose-4-phosphate, generated via the pentose phosphate pathway and phosphoenolpyruvate. This pathway is used by *S. pneumoniae* and *L. monocytogenes* [68]. However, in pneumococci, at least in strain D39, serine is not labeled by this pathway. Instead formation of serine occurred via the reverse reaction, namely by hydroxymethylation of glycine [18]. The reaction used by *S. pneumoniae* to replenish the serine pool is rather unconventional among bacterial species. Most bacterial species, such as *Streptococcus thermophilus* [79,80] and *L. monocytogenes* [68,77], prefer the conversion of serine to glycine, catalyzed by serine hydroxymethyltransferase (SHMT).

3.3. Acetate metabolism

S. pneumoniae is an aerotolerant bacterium and catabolizes glucose by glycolysis to two molecules of ATP by substrate-level phosphorylation finally producing pyruvate. The acetate metabolism is a process of acetate dissimilation (production and excretion) and assimilation (import and utilization), which is also known as “acetate switch” [81]. Acetate dissimilation involves the conversion of pyruvate to acetyl coenzyme A (CoA) and other metabolites, including acetyl phosphate (AcP). AcP can be converted by the acetate kinase (AckA) to ATP and acetate to generate one molecule of ATP [81–83]. Three enzymes are involved in the AcP synthesis in *S. pneumoniae*. The SpxB pyruvate oxidase, which uses oxygen and inorganic phosphate to convert pyruvate into AcP and H_2O_2 [84–87] and in phosphotransacetylase (Pta)-AckA pathway the AckA converts AcP produced by Pta or SpxB to

acetate and ATP. Alternatively, in the reverse reaction, acetate is catalyzed to ADP and AcP [81,82].

3.4. Absent pathways

Several important pathways, such as the Entner-Doudoroff (ED) pathway, the aerobic tricarboxylic acid cycle (TCA), also known as Krebs cycle, and the electron transport chain of aerobic and anaerobic respiration are most likely not used in *S. pneumoniae* metabolism. Many Gram-positive bacteria lack the TCA cycle, such as *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., and *Mycoplasma* spp [88]. This is due to the lack of genes encoding the enzymes involved in these pathways [31]. Although, pneumococci do not possess the genes for the TCA cycle enzymes [18], several enzymes of this pathway are still present: the pyruvate dehydrogenase E1 β (SP_1163), the dihydrolipoamide acetyltransferase (SP_1162) and the dihydrolipoamide dehydrogenase (SP_1161). In fact, *S. pneumoniae* express these enzymes in form of a shortened TCA pathway. Some intermediates of the TCA cycle such as fumarate, succinate and 2-oxoglutaric acid were identified. Leonard et al. hypothesized that fumarate is produced during the synthesis of ornithine by the urea cycle and 2-oxoglutaric acid is involved in the glutamine degradation. Fumarate could also originate through tyrosine degradation [36]. Furthermore, isotopic labeling of aspartic acid and threonine indicated that the formation of oxaloacetate occurs exclusively via the phosphoenolpyruvate carboxylase reaction, as described by Härtel et al. [18]. The same study showed that α -ketoglutarate was generated from unlabeled glutamate via the aspartate transaminase reaction [18]. The ^{13}C -labeled isotopologue patterns in amino acids from [U- $^{13}\text{C}_6$]- or [1,2- $^{13}\text{C}_2$] glucose as precursors identified EMP (glycolysis) as the predominant metabolic pathway to catabolize glucose and revealed the pathways for *de novo* synthesis of amino acids in *S. pneumoniae* [18]. However, not all 20 amino acids can be synthesized *de novo*. The analyses of pneumococcal genomes revealed incomplete pathways for the biosynthesis of cysteine, glycine, glutamine, glutamic acid and histidine and probably lysine and proline [31,33]. *S. pneumoniae* is able to produce cell wall-located peptidases and proteases to digest proteins and transporters for the uptake of amino acids and oligopeptides [65,66,89].

The lack of a complete TCA cycle for *S. pneumoniae* has a great impact on amino acid synthesis, as TCA cycle intermediates are critical for the *de novo* synthesis of many amino acids and porphyrins. Oxaloacetate is a precursor for aspartate, asparagine, lysine, cysteine, threonine, isoleucine and methionine biosynthesis, while α -ketoglutarate is a precursor of glutamine, glutamate, arginine, and proline. Moreover, succinate is a precursor for the porphyrin biosynthesis [90–92,92]. Nevertheless, different serotypes display particular metabolic patterns. For example, the arginine-deiminase system (ADS) including the arginine-ornithine antiporter ArcD is essential for the virulence of TIGR4 [16], but the ADS is not completely functional in strain D39 due to the lack of enzymatic activity of the truncated arginine deiminase.

3.5. Metabolites – responsive global regulators and virulence factors

The survival of bacterial pathogens in different host environments depends on several factors. These include the expression of specific virulence factors, uptake systems recognizing nutrients and the bacterial versatility to adapt to various physiological conditions. *S. pneumoniae* produces a repertoire of virulence factors, including capsular polysaccharide (CPS), autolysins, adhesins such as the pneumococcal surface protein (PspC) and the pore-forming toxin pneumolysin [93–97] (see Fig. 2).

3.5.1. Carbohydrate and the catabolite control protein A (CcpA)

Accumulating evidence suggest a direct link between pneumococcal virulence and sugar metabolism [35,84,98–100]. CcpA is a global

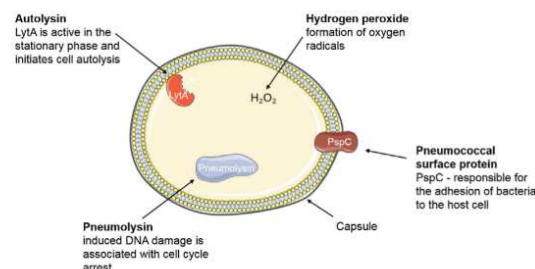


Fig. 2. Virulence factors of *Streptococcus pneumoniae* acting against the host cell defense. Important pneumococcal virulence factors are illustrated: autolysin A (LytA); pneumolysin; the capsule; pneumococcal surface protein and hydrogen peroxide. The Figure was created with help from <http://smart.servier.com/>.

transcriptional regulator of carbon metabolism genes in response to the availability of several carbon sources. The regulatory protein CcpA controls several metabolism and virulence genes in *Streptococcus* [40,101–103], *Lactococcus* [104], *Staphylococcus* [105], and *Bacillus* [106]. Carbon catabolite control can be achieved by different regulatory mechanisms, i.e. transcription activation and repression of genes by global regulators, control of translation by RNA-binding proteins, and allosteric regulation. CcpA proteins are members of the LacI family and bind to a DNA sequence (*cre* site). Carbohydrates, such as glucose, activate CcpA indirectly via HPr, a component of a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system (PTS) [107]. The same multiple effects of CcpA on virulence gene expression were observed for other *Streptococcus* spp. The pneumococcal *ccpA* mutant showed a reduced expression of the CPS [99]. Moreover, CcpA was shown to regulate the autolysis of *S. mutants* in response to glucose availability [108].

3.5.2. CodY

The CodY regulator is found in many low G+C Gram-positive bacteria. The activity of CodY is regulated by two types of ligands: by BCAAs (isoleucine, leucine, and valine), which are effectors of CodY activity [109,110] and by guanosine triphosphate (GTP), which activates CodY [111,112] in several bacteria, except *Streptococcus* [34] and *Lactococcus* [113]. The metabolic genes regulated by CodY are involved in many pathways e.g., amino acid biosynthesis pathway, purine biosynthesis, TCA cycle, energy metabolism and carbon metabolism. According to Hendriksen et al., *S. pneumoniae* *codY* mutant proved to be defective in colonization [34]. A later report reached other conclusions, claiming that a *codY* null mutation in *S. pneumoniae* is lethal. An effect of a *codY* mutation virulence, may have the compensatory mutations rather than the *codY* mutation itself [114].

3.5.3. Autolysin

During stationary phase, *S. pneumoniae* has a characteristic autolysis response causing lysis of bacteria. The major pneumococcal autolysin LytA, a protein belonging to the special class of pneumococcal choline-binding proteins (CBP) has been shown to be localized mainly intracellularly, and in a small fraction non-covalently attached to the phosphorylcholine of teichoic acids [115]. During exponential growth pneumococci are protected from lysis, but this protection ends during the stationary phase [115]. LytA accumulates at the cell surface all along the stationary phase up to a 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentration [115]. Next, LytA is activated for the termination of cell wall synthesis and the bacterial cell will be lysed. Lack of nutrients or several drug treatments can initiate termination of cell wall synthesis [93]. Consequently, there is an intracellular release of the pneumococcal pore forming toxin pneumolysin and inflammatory cell wall products. LytA causes lysis by cleaving the lactyl-amide bond that links the stem peptides and the glycan strands of the peptidoglycan, resulting in hydrolysis of the cell

wall [116].

Pneumococcal LytA is structurally organized in two domains: an N-terminal N-acetylmuramoyl L-alanine amidase domain and a C-terminal choline-binding module (CBM). The C-terminal domain binds to phosphorylcholine residues present on the teichoic acids of the cell wall [117] and hence, high choline concentration can inhibit cell wall binding of LytA to teichoic acids [118].

3.5.4. Pneumococcal surface protein PspC

The PspC protein is also a CBP and is also known as SpsA, Hic, or C3-binding protein [119–122]. PspC is a major adhesin of pneumococci and plays an important role in nasopharyngeal colonization by binding to the polymeric immunoglobulin receptor plgR of epithelial cells [123].

PspC has further multiple adhesive and biological function including binding to secretory component of secretory IgA, to the complement protein C3 [122], to the human factor H [124,125] and binding to human thrombospondin-1 and complement inhibitor vitronectin [95,96,120,122,124–126].

3.5.5. Hydrogen peroxide

In *S. pneumoniae*, hydrogen peroxide (H_2O_2) is produced by the pyruvate oxidase, encoded by *spxB* gene [84]. H_2O_2 secreted by *S. pneumoniae* can contribute to induced oxidative stress and elicit DNA damage, which in turn leads to cell death. Rai et al. showed that *S. pneumoniae* induces toxic DNA double-strand breaks (DSBs) [127]. In response to DSBs, the ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase pathway is activated, leading to phosphorylation of histone H2AX, and co-localization with p53-binding protein (53BP1) [128,129]. Pneumococci are protective against oxidative stress by producing a surface CcdA-thioredoxin-methionine sulfoxide reductase (CEM) protein complex. CEM is an electron transport system aiming to reduce and repair oxidized proteins [130,131].

3.5.6. Pneumolysin

S. pneumoniae produces the cytotoxic and cytolytic toxin pneumolysin as a key virulence factor against host cells. Pneumolysin is located in the bacterial cytoplasm but is probably not actively secreted [132,133]. Structurally, pneumolysin is a single polypeptide chain composed of 471 amino acids [134]. This peptide is a cholesterol-dependent cytolytic (CDC) toxin that forms lytic pores in host membranes [135]. CDCs mediate host cell death by binding to membrane cholesterol and oligomerizing to form macromolecular pores that perforate host membrane to mediate cell lysis [136,137]. Rai et al. reveal that pneumolysin is able to induce DSBs in alveolar epithelial cells [138]. The same study concluded that pneumolysin-induced DNA damage is associated with cell cycle arrest and pneumolysin binding and oligomerization in the membrane plays significant role in its genotoxicity [138].

Purified pneumolysin is a protective immunogen against pneumococcal diseases in mouse model of pneumonia [132]. Moreover, pneumolysin triggers activation of pro-inflammatory immune cells, leading to release of reactive oxygen and nitrogen species that damage host tissues [139,140].

4. Antibiotic mechanisms, resistance and new compounds

4.1. Mechanisms of antibiotics

Global transcriptome analysis of fluoroquinolone-resistance *S. pneumoniae* following ciprofloxacin treatment showed an effect of antibiotic efflux [141]. Furthermore, a microarray-based gene expression analysis performed on *S. pneumoniae* showed that fluoroquinolones induce upregulation of the *fatDCEB* operon coding an iron transporter. Subsequently, the intracellular iron concentration increased leading to accumulation of ROS [142]. Aminoglycosides and fluoroquinolones, as

Table 2

Summary of antibiotics effects on pneumococcal metabolism and possible new antimicrobial substance.

	Effects of ...		Source
Antibiotic effects of pneumococcal metabolism	Antibiotic efflux		[141]
	increasing glutamine concentration		[154]
	upregulation of iron transporter		[142]
	Transformation of bacterial		[143]
	Apoptosis and necrosis		[144]
	Compounds	Mechanism	Source
New antimicrobial substance	Properdin	promotes complement activation	[168]
	Liposomes	protective shield of the liquid layer	[170]
	Teixobactin	inhibits cell wall synthesis	[173]
	Relacin	blocked ribosome synthesis	[177]
	Feglymycin	inhibited the peptidoglycan biosynthesis	[180]
	Carolacton	damaged membrane	[183]

well as mitomycin C, a DNA-damaging agent, were shown to induced important metabolic transformation in *S. pneumoniae* (*com* regulon) [143]. Koch et al. advanced the idea that azithromycin may promote apoptosis, this contributing to its antibacterial properties. Azithromycin induces polymorphonuclear leukocyte (PMN) apoptosis in the absence of *S. pneumoniae*. Addition of *S. pneumoniae* lysate inhibited the induction of apoptosis by azithromycin, but did not effect PMN necrosis. Azithromycin did not affect PMN oxidative metabolism or IL-8 production with bacterial lysate. In contrast, dexamethasone significantly inhibited pneumococci lysate-induced IL-8 synthesis. The pro-apoptotic effect of azithromycin is abolished when neutrophils are incubated with *S. pneumoniae* lysate. The necrosis levels were identical regardless the presence or the absence of *S. pneumoniae* and the low level of apoptosis was not result of a necrosis incensement. The mechanism of which the *S. pneumoniae* products may reverse or even inhibit the apoptotic signal remains unclear [144]. The number of new antibiotics available for treating *S. pneumoniae* is still very limited and a connection of action against metabolic features of pneumococci in the host environment maybe promising [145] (see Table 2).

4.2. Antibiotic resistance

S. pneumoniae is an important cause of respiratory illnesses. Traditionally, *S. pneumoniae* infections are treated with penicillin and ampicillin (see Table 1) [146]. But over the past years the pathogen resistance to antibiotics has increased worldwide [146–149]. It must be pointed out that antibiotic resistance of *S. pneumoniae* strongly depends on the country and region. For example, erythromycin resistance is 15% in Latin America and reaches 80% in the Far East probably due to the misuse of antibiotics [150]. However, the mechanisms of resistance is comparable. β -lactamases inhibit the growth of *S. pneumoniae* by inactivation of cell wall-synthesizing penicillin-binding proteins (PBPs) [151] and mutations in MurM [152]. PBPs are membrane-associated enzymes involved in the final step of peptidoglycan assembly [153]. El Khoury et al. showed an increase in glutamine concentrations (4-to-20 fold) following exposure of *S. pneumoniae* to penicillin [154]. The operon GlnHP (an ABC transporter that binds glutamine and glutamate [65]) contributes to a higher uptake and accumulation of glutamine and glutamate in R6 [154]. The gene GlnA encodes glutamine synthetase, which is responsible for the conversion of glutamate and ammonium into glutamine [89]. GlnA leads to penicillin sensitization in *S. pneumoniae* and chemical inhibition of GlnA in penicillin-resistant *S.*

pneumoniae decreased their level of resistance [154]. The same study proposed that inhibiting GlnA would increase penicillin susceptibility but would also reduce virulence. Maybe it has a positive effect when treatment is combined with existing β -lactam antibiotics [154].

Macrolides inhibit the bacterial protein synthesis by binding to the 23 S ribosomal RNA (rRNA). The resistance is mediated by two major mechanism: target modification of erm(B) [155] and efflux mechanisms (mef(A) or mef(E)) [156,157]. The resistance of rifampin is caused by an alternation of the β -subunit of RpoB RNA polymerase, the target for the antibiotic [158]. Tetracycline resistance to *S. pneumoniae* is due to the TetM or TetO proteins, which protect the bacterial 30S ribosome subunits against antibiotic binding [159]. Trimethoprim resistance in *S. pneumoniae* has been reported to results from a single amino acid substitution (isoleucine to leucine) in the dihydrofolate reductase (DHFR) protein [160]. Resistance to sulfonamides is associated with chromosomal mutations within the gene encoding dihydropteroate synthase (DHPS) [161]. Mutation in the 23S rRNA subunits occur following oxazolidinone [162] and ketolide treatment [163]. The fluoroquinolone resistance is associated with mutation in DNA gyrase (gyrA) and topoisomerase IV genes (*parC*) [164]. These two enzymes are essential for DNA replication and cell division. Although antibiotic resistance is increasing, many antibiotics are still able to induce important changes in the metabolome of *S. pneumoniae* (see Table 2).

4.3. New antimicrobial compounds and strategies

In the future, new antibacterial compounds are necessarily needed to ensure successful treatments against *S. pneumoniae* and resistant strains (see Table 1). As a starting point for rational drug design, novel compounds could be used or the underexploited cellular mechanisms of bacteria could be capitalized [165].

Properdin is a potential new antimicrobial substance, which is present in serum at a concentration of ~5–15 $\mu\text{g/ml}$ [166]. Low-dose recombinant properdin provides protection against *S. pneumoniae* infection [167,168]. It promotes complement activation via the alternative pathway. In 1954, Pillemer et al. described properdin as a serum protein that mediates complement activation in the absence of antibodies, exerting an antimicrobial activity [169].

Recently, Henry et al. developed a new substance for protecting patients against bacterial infection without assignment of antibiotics [170]. Liposomes are artificial nanoparticles formed from constituents of the lipid layer of eukaryotic cells and are able to develop a protective shield. This shield captures the ejected bacterial toxins and neutralizes them. Thus, the bacteria are less harmful and can be annihilated by the immune system thereby becoming host cell harmless. The effect of liposomes cannot be directed against the bacteria itself. Therefore no resistance mechanism can be further developed.

The uncultured organisms represent another source for new antibiotics/antimicrobial substances. Uncultured bacteria make up for approximately 99% of all species from the external environments [171]. Using, iChip [172], a new method to grow uncultured organisms by cultivation in their natural environment, new substances, such as teixobactin, were discovered [173]. Teixobactin is a depsipeptide, which contains enduracididine, methylphenylalanine, and four D-amino acids. Teixobactin inhibits cell wall synthesis by binding to highly conserved motif of lipid II and lipid III. Lipid II is a precursor of peptidoglycan and lipid III is a precursor of cell wall teichoic acid. At the moment, no resistance against Teixobactin is known.

The second messenger guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate ((p)ppGpp) are involved in regulating growth and different stress responses in bacteria [174]. Simultaneously (p)ppGpp have important roles in antibiotic resistance [175]. The (p)ppGpp-based nucleotide Relacin was developed to directly target the RelA-SpoT homologue (RSH) family of enzymes [176,177]. Upon nutrient deprivation, Rel proteins bind to the ribosomes blocked by uncharged tRNA and catalyze the synthesis of (p)ppGpp [176]. Also, the

antibiofilm peptide 1018 has an effect of (p)ppGpp. Antibiofilm peptide 1018 promotes the hydrolysis of (p)ppGpp formed in the cell [178]. Feglymycin, synthesized from *Streptomyces* sp. DSM 11171 [179], consists of nonproteinogenic amino acids such as 4-hydroxyphenylglycine and 3,5-dihydroxyphenylglycine [180]. Hänchen et al. used the alanine-scan technique to study the relation specific residues of feglymycin to its antibacterial activity. Feglymycin inhibited the peptidoglycan biosynthesis enzymes of MurA and MurC, dependent mainly on L-Asp13 [180]. It is the natural product inhibitor with MurC as a main target.

Another promising antimicrobial agent is Carolacton, a mycobacterial secondary metabolite produced by *Sorangium cellulosum* [181]. The macrolide ketocarboxylic acid can be synthesized *de novo* [182]. Carolacton was discovered to cause membrane damage in *S. mutants* biofilms and to inhibit the planktonic growth of *S. pneumoniae* TIGR4 and some multidrug-resistant clinical isolates of serotypes 19A at nanomolar concentrations [183]. Moreover, carolacton treatment caused a reduction in the membrane potential of bacteria, which did not alter the membrane integrity, but initiated compensatory reaction of the cells, as transcriptome analysis has revealed. Following their observations, Donner et al. concluded that Carolacton might represent a potential agent for treating pneumococcal infections [183].

5. Conclusion

S. pneumoniae is comparison to other pathogenic microorganisms like *E. coli* or *Staphylococcus aureus* less well explored OMICS technologies, like metabolomics, represent a powerful tool for the characterization of infections and interactions between pathogen and its host. Facing the extension of our knowledge it would be important to integrate different types of OMICS data from genomics, proteomics, transcriptomics and metabolomics. In particular the adaptation of the host environment towards the infection processes is not well understood so far and an emerging topic of research.

Abbreviations

%	Percent
μg	Microgram
μm	Micro molar
3-PGA	3-phosphoglycerate
53BP1	p53-binding protein
ABC	ATP-binding cassette
AckA	Acetate kinase A
AcP	Acetyl phosphate
ADP	Adenosine diphosphate
ADS	Arginine deiminase system
Ald	Acetaldehyde
ArcD	Arginine-ornithine antiporter
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosine triphosphate
ABC	ATP-binding cassette transporter
BCAA	Branched chain amino acids
B-cell	B lymphocytes
CBM	Choline-binding module
CBP	Choline-binding protein
CbpA	Choline-binding protein A
CcpA	Catabolite control protein A
CCR	Carbon catabolite
CDC	Cholesterol-dependent cytolysin
CEM	CcdA-thioredoxin-methionine sulfoxide reductase
CO ₂	Carbon dioxide
CoA	Coenzyme A

CodY	Global regulator transcriptional pleiotropic repressor
CPS	Capsular polysaccharide
DHFR	Dihydrofolate reductase
DHPS	Dihydropteroate synthase
dL	Dezi liter
DNA	Desoxyribonucleic acid
DSB	Double-strand breaks
ED	Entner-Doudoroff
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
ermB	rRNA adenine N-6-methyltransferase
et al.	et aliae
FBP	Fructose-6-phosphate
G + C	guanine-cytosine content
G1P	Glucose-1-phosphate
G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate
G6P	Glucose-6-phosphate
GC	Gas chromatography
GTP	Guanosine triphosphate
GlnA	Glutamine synthetase, type I
GlnH	ABC transporter that binds glutamine and glutamate
GlnR	Transcriptional repressor of the glutamine synthetase gene
gyrA	Gyrase
Hic	Factor H-binding inhibitor of complement
HIV	Human immunodeficiency virus
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
HP _r	Phosphoryl carrier protein
i.e.	id est
IgA	Immunoglobulin A
IL	Interleukin
LacG	Phospho-β-galactosidase
LacR	Lactose phosphotransferase system repressor
LacT	Transcriptional antiterminator
LC	Liquid chromatography
LDH	Lactate dehydrogenase
LytA	Autolysin
Mg ²⁺	Magnesium
ml	Milliliter
Mn ²⁺	Manganous
MurM	Enzyme involved in the biosynthesis of branched-stem cell wall muropeptides
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NH ₃	Ammonium
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Mg	Milligram
MurC	UDP-N-acetylmuramate alanine ligase
parC	Topoisomerase IV gene
PBP	Penicillin-binding protein
PDHC	Pyruvate dehydrogenase complex
PEP	Phosphoenolpyruvate
PFL	Pyruvate formate lyase
pH	Potential of hydrogen
PMN	Polymorphonuclear leucocyte
PPP	Pentose phosphate pathway
(p)ppGpp	Guanosin-3',5'-bispyrophosphat
PspC	Pneumococcal surface protein
Pta	Phosphotransacetylase
PTS	Phosphotransferase systeme
R5P	Ribulose 5-phosphate
RKI	Robert-Koch-Institute
RNA	Ribonucleotid acid
ROS	Reactive oxygen species

rpoB	β subunit of bacterial RNA polymerase
rRNA	Ribosomale RNA
S7P	Sedoheptulose-7-phosphate
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SHMT	Serine hydroxymethyltransferase
Spp.	Species
spxB	Pyruvate oxidase
SpsA	Pneumococcal surface protein
TCA	Tricarboxylic Acid Cycle
T-cell	T lymphocyte
Tet	Tetracycline resistance operon
UDP-Glc	Uridine diphosphate glucose
USA	United States of America
UTP-Gal	Uridine triphosphate galactose
X5P	Xylulose-5-phosphate

Acknowledgements

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG): DFG-GRK 1870. We thank Daniel Schultz, Alina Uifălean and Sven Hammerschmidt for critical reading.

Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

References

- [1] D. Bogaert, R. de Groot, P.W.M. Hermans, *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease, *Lancet Inf. Dis.* 4 (3) (2004) 144–154, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)00938-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)00938-7).
- [2] World Health Organization, Pneumococcal vaccines WHO position paper - 2012 - recommendations, *Vaccine* 30 (32) (2012) 4717–4718, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.04.093>.
- [3] K.L. O'Brien, L.J. Wolfson, J.P. Watt, E. Henkle, M. Deloria-Knoll, N. McCall, E. Lee, K. Mulholland, O.S. Levine, T. Chierian, Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: Global estimates, *Lancet* (London, England) 374 (9693) (2009) 893–902, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61204-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61204-6).
- [4] M. Camps Serra, C. Cervera, T. Pumarola, A. Moreno, R. Perelló, A. Torres, M.T. Jiménez de Anta, M.A. Marcos, Virological diagnosis in community-acquired pneumonia in immunocompromised patients, *Eur. Resp. J.* 31 (3) (2008) 618–624, <https://doi.org/10.1183/09031936.00073807>.
- [5] T. Welte, A. Torres, D. Nathwani, Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe, *Thorax* 67 (1) (2012) 71–79, <https://doi.org/10.1136/thx.2009.129502>.
- [6] World Health Organization, Pneumoniae: Fact sheet N°331, Updated November 2015, 2015 < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/> > .
- [7] S.S. Huang, K.M. Johnson, G.T. Ray, P. Wroe, T.A. Lieu, M.R. Moore, E.R. Zell, J.A. Linder, C.G. Grijalva, J.P. Metlay, J.A. Finkelstein, Healthcare utilization and cost of pneumococcal disease in the United States, *Vaccine* 29 (18) (2011) 3398–3412, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.02.088>.
- [8] S. Obaro, R. Adegbola, The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines, *J. Med. Microbiol.* 51 (2) (2002) 98–104, <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-2-98>.
- [9] H. Wang, M. Naghavi, C. Allen, R.M. Barber, Z.A. Bhutta, A. Carter, et al., Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015, *Lancet* (London, England) 388 (10053) (2016) 1459–1544, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31012-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31012-1).
- [10] J.P. Lynch, G.G. Zhan, *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology, risk factors, and strategies for prevention, *Semin. Resp. Crit. Care Med.* 30 (2) (2009) 189–209, <https://doi.org/10.1055/s-0029-1202938>.
- [11] S. Ewig, G. Höffken, W.V. Kern, G. Rohde, H. Flick, R. Krause, S. Ott, T. Bauer, K. Dalhoff, S. Gatermann, M. Kolditz, S. Krüger, J. Lorenz, M. Pletz, A. de Roux, B. Schaaf, T. Schaberg, H. Schütte, T. Welte, Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und Prävention - Update 2016, *Pneumologie* (Stuttgart, Germany) 70 (3) (2016) 151–200, <https://doi.org/10.1055/s-0042-101873>.
- [12] R. Link-Gelles, A. Thomas, R. Lynfield, S. Petit, W. Schaffner, L. Harrison, M.M. Farley, D. Aragon, M. Nicols, P.D. Kirley, S. Zansky, J. Jorgensen, B.A. Juni, D. Jackson, M.R. Moore, M. Lipsitch, Geographic and temporal trends in antimicrobial nonsusceptibility in *Streptococcus pneumoniae* in the post-vaccine era in the United States, *J. Inf. Dis.* 208 (8) (2013) 1266–1273, <https://doi.org/10.1093/infdis/jit315>.
- [13] C. Cillóniz, C. Ardanuy, J. Vila, A. Torres, What is the clinical relevance of drug-

- resistant pneumococcus? *Curr. Opin. Pulm. Med.* 22 (3) (2016) 227–234, <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000262>.
- [14] R.W. French Jr., A. Fiquet, A. Gurtman, M. van Cleef, M. Davis, J. Rubino, W. Smith, V. Sundaraiyer, M. Sidhu, E.A. Emini, W.C. Gruber, D.A. Scott, B. Schmoele-Thoma, Immunogenicity and safety of a second administration of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine 5 years after initial vaccination in adults 50 years and older, *Vaccine* (2016), <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.093>.
 - [15] L. Paixão, J. Caldas, T.G. Kloosterman, O.P. Kuipers, S. Vinga, A.R. Neves, Transcriptional and metabolic effects of glucose on *Streptococcus pneumoniae* sugar metabolism, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 1041, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01041>.
 - [16] C. Schulz, P. Gierok, L. Petruschka, M. Lalk, U. Mäder, S. Hammerschmidt, Regulation of the arginine deiminase system by ArgR2 interferes with arginine metabolism and fitness of *Streptococcus pneumoniae*, *mBio* 5 (6) (2014), <https://doi.org/10.1128/mBio.01858-14>.
 - [17] C. Schulz, S. Hammerschmidt, Exploitation of physiology and metabolomics to identify pneumococcal vaccine candidates, *Expert Rev. Vacc.* 12 (9) (2013) 1061–1075, <https://doi.org/10.1586/14760584.2013.824708>.
 - [18] T. Härtel, E. Eylert, C. Schulz, L. Petruschka, P. Gierok, S. Grubmüller, M. Lalk, W. Eisenreich, S. Hammerschmidt, Characterization of central carbon metabolism of *Streptococcus pneumoniae* by isotopologue profiling, *J. Biol. Chem.* 287 (6) (2012) 4260–4274, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.304311>.
 - [19] G.A. Somerville, R.A. Proctor, At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci*, *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* MMBR 73 (2) (2009) 233–248, <https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-09>.
 - [20] B.C. Kahl, M. Goulian, V. van Wamel, M. Herrmann, S.M. Simon, G. Kaplan, G. Peters, A.L. Cheung, *Staphylococcus aureus* RN6390 replicates and induces apoptosis in a pulmonary epithelial cell line, *Infect. Immun.* 68 (9) (2000) 5385–5392.
 - [21] O. Warburg, On the origin of cancer cells, *Science* (New York, N.Y.) 123 (3191) (1956) 309–314.
 - [22] L. Alekseeva, L. Rault, S. Almeida, P. Legembre, V. Edmond, V. Azevedo, A. Miyoshi, S. Even, F. Taieb, Y. Arlot-Bonnemains, Y. Le Loir, N. Berkova, *Staphylococcus aureus*-induced G2/M phase transition delay in host epithelial cells increases bacterial infective efficiency, *PLoS One* 8 (5) (2013) e63279, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063279>.
 - [23] A. Uifalean, S. Schneider, P. Gierok, C. Ionescu, C.A. Iuga, M. Lalk, The impact of soy isoflavones on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells using a global metabolomic approach, *Int. J. Molec. Sci.* 17 (9) (2016), <https://doi.org/10.3390/ijms17091443>.
 - [24] P. Gierok, M. Harms, E. Richter, J.-P. Hildebrandt, M. Lalk, J. Mostertz, F. Hochgräfe, *Staphylococcus aureus* alpha-toxin mediates general and cell type-specific changes in metabolite concentrations of immortalized human airway epithelial cells, *PLoS One* 9 (4) (2014) e94818, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094818>.
 - [25] M. Deplanche, R.A.E.-A. Filho, L. Alekseeva, E. Ladier, J. Jardin, G. Henry, V. Azevedo, A. Miyoshi, L. Beraud, F. Laurent, G. Lina, F. Vandenesch, J.-P. Steghens, Y. Le Loir, M. Otto, F. Götz, N. Berkova, Phenol-soluble modulins induce G2/M phase transition delay in eukaryotic HeLa cells, *FASEB J. Off. Pub. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 29 (5) (2015) 1950–1959, <https://doi.org/10.1096/fj.14-260513>.
 - [26] R. Wang, K.R. Braughton, D. Kretschmer, T.-H.L. Bach, S.Y. Queck, M. Li, A.D. Kennedy, D.W. Doward, S.J. Klebanoff, A. Peschel, F.R. DeLeo, M. Otto, Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA, *Nature Med.* 13 (12) (2007) 1510–1514, <https://doi.org/10.1038/nm1656>.
 - [27] Yokota S-i, T. Okabayashi, N. Yokosawa, N. Fujii, Growth arrest of epithelial cells during measles virus infection is caused by upregulation of interferon regulatory factor 1, *J. Virol.* 78 (9) (2004) 4591–4598.
 - [28] M. Liljeroos, R. Vuolteenaho, S. Rounioja, B. Henriques-Normark, M. Hallman, M. Ojaniemi, Bacterial ligand of TLR2 signals Stat activation via induction of IRF1/2 and interferon-alpha production, *Cell. Signal* 20 (10) (2008) 1873–1881, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.06.017>.
 - [29] E. Richter, M. Harms, K. Ventz, P. Gierok, R.K. Chilukoti, J.-P. Hildebrandt, J. Mostertz, F. Hochgräfe, A multi-omics approach identifies key hubs associated with cell type-specific responses of airway epithelial cells to *Staphylococcal* alpha-toxin, *PLoS One* 10 (3) (2015) e0122089, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122089>.
 - [30] K. Maurer, T. Reyes-Robles, F. Alonzo, J. Durbin, V.J. Torres, K. Cadwell, Autophagy mediates tolerance to *Staphylococcus aureus* alpha-toxin, *Cell Host Microbe* 17 (4) (2015) 429–440, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.03.001>.
 - [31] J. Hoskins, W.E. Alborn, J. Arnold, L.C. Blaszcak, S. Burgett, B.S. DeHoff, S.T. Estrem, L. Fritz, D.J. Fu, W. Fuller, C. Geringer, R. Gilmour, J.S. Glass, H. Khoja, A.R. Kraft, R.E. Lagace, D.J. LeBlanc, L.N. Lee, E.J. Lefkowitz, J. Lu, P. Matsushima, S.M. McAhren, M. McHenry, K. McLeaster, C.W. Mundy, T.I. Nicas, F.H. Norris, M. O'Garra, R.B. Peery, G.T. Robertson, P. Rockey, P.M. Sum, M.E. Winkler, Y. Yang, M. Young-Bellido, G. Zhao, C.A. Zook, R.H. Baltz, S.R. Jaskunas, P.R. Rostek, P.L. Skatrud, J.I. Glass, Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6, *J. Bacteriol.* 183 (19) (2001) 5709–5717, <https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5709-5717.2001>.
 - [32] I.T. Paulsen, L. Nguyen, M.K. Sliwinski, R. Rabus, M.H. Saier, Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes, *J. Mol. Biol.* 301 (1) (2000) 75–100, <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3961>.
 - [33] H. Tettelin, K.E. Nelson, I.T. Paulsen, J.A. Eisen, T.D. Read, S. Peterson, J. Heidelberg, R.T. DeBoy, D.H. Haft, R.J. Dodson, A.S. Durkin, M. Gwinn, J.F. Kolonay, W.C. Nelson, J.D. Peterson, L.A. Umayam, O. White, S.L. Salzberg, M.R. Lewis, D. Radune, E. Holtzapple, H. Khouri, A.M. Wolf, T.R. Utterback, C.L. Hansen, L.A. McDonald, T.V. Feldblyum, S. Angiuoli, T. Dickinson, E.K. Hickey, I.E. Holt, B.J. Loftus, F. Yang, H.O. Smith, J.C. Venter, B.A. Dougherty, D.A. Morrison, S.K. Hollingshead, C.M. Fraser, Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*, *Science* (New York, N.Y.) 293 (5529) (2001) 498–506, <https://doi.org/10.1126/science.1061217>.
 - [34] W.T. Hendriksen, H.J. Bootsma, S. Estevão, T. Hoogenboezem, A. de Jong, R. de Groot, O.P. Kuipers, P.W.M. Hermans, CodY of *Streptococcus pneumoniae*: link between nutritional gene regulation and colonization, *J. Bacteriol.* 190 (2) (2008) 590–601, <https://doi.org/10.1128/JB.00917-07>.
 - [35] R. Iyer, N.S. Baliga, A. Camilli, Catabolite control protein A (CcpA) contributes to virulence and regulation of sugar metabolism in *Streptococcus pneumoniae*, *J. Bacteriol.* 187 (24) (2005) 8340–8349, <https://doi.org/10.1128/JB.187.24.8340-8349.2005>.
 - [36] A. Leonard, P. Gierok, K. Methling, A. Gómez-Mejía, S. Hammerschmidt, M. Lalk, Metabolic inventory of *Streptococcus pneumoniae* growing in a chemically defined environment, *Int. J. Med. Microbiol.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.01.001>.
 - [37] A.R. Richardson, G.A. Somerville, A.L. Sonenshein, Regulating the intersection of metabolism and pathogenesis in gram-positive bacteria, *Microbiol. Spect.* 3 (3) (2015), <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MBP-0004-2014>.
 - [38] W. Kundig, S. Ghosh, S. Roseman, Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phospho-transferase system, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 52 (1964) 1067–1074.
 - [39] M.H. Saier Jr., Protein phosphorylation and allosteric control of inducer exclusion and catabolite repression by the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system, *Microbiol. Rev.* 53 (1) (1989) 109–120.
 - [40] S.M. Carvalho, T.G. Kloosterman, O.P. Kuipers, A.R. Neves, CcpA ensures optimal metabolic fitness of *Streptococcus pneumoniae*, *PLoS One* 6 (10) (2011) e26707, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026707>.
 - [41] M. Portnoi, E. Ling, G. Feldman, R. Dagan, Y. Mizrahi-Nebenzahl, The vaccine potential of *Streptococcus pneumoniae* surface lectin- and non-lectin proteins, *Vaccine* 24 (11) (2006) 1868–1873, <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.10.053>.
 - [42] M. Fulde, N. Bernardo-García, M. Rohde, N. Nachtigall, R. Frank, K.T. Preissner, J. Klett, A. Morreale, G.S. Chhatwal, J.A. Hermoso, S. Bergmann, Pneumococcal phosphoglycerate kinase interacts with plasminogen and its tissue activator, *Thromb. Haemost.* 111 (3) (2014) 401–416, <https://doi.org/10.1160/TH13-05-0421>.
 - [43] S. Bergmann, M. Rohde, G.S. Chhatwal, S. Hammerschmidt, alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface, *Mol. Microbiol.* 40 (6) (2001) 1273–1287.
 - [44] S. Bergmann, M. Rohde, S. Hammerschmidt, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein, *Inf. Immun.* 72 (4) (2004) 2416–2419.
 - [45] J. Deutscher, F.M.D. Aké, M. Derkaoui, A.C. Zébré, T.N. Cao, H. Bouraoui, T. Kentache, A. Mokhtari, E. Milohanic, P. Joyet, The bacterial phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system: regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions, *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* MMBR 78 (2) (2014) 231–256, <https://doi.org/10.1128/MMBR.00001-14>.
 - [46] J. Deutscher, C. Francke, P.W. Postma, How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria, *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* MMBR 70 (4) (2006) 939–1031, <https://doi.org/10.1128/MMBR.00024-06>.
 - [47] N.J. Croucher, D. Walker, P. Romero, N. Lennard, G.K. Paterson, N.C. Bason, A.M. Mitchell, M.A. Quail, P.W. Andrew, J. Parkhill, S.D. Bentley, T.J. Mitchell, Role of conjugative elements in the evolution of the multidrug-resistant pandemic clone *Streptococcus pneumoniae*^{Spain23F} ST81, *J. Bacteriol.* 191 (5) (2009) 1480–1489, <https://doi.org/10.1128/JB.01343-08>.
 - [48] M.L. Forbes, E. Horsey, N.L. Hiller, F.J. Buchinsky, J.D. Hayes, J.M. Compliment, T. Hillman, S. Ezzo, K. Shen, R. Keefe, K. Barbadora, J.C. Post, F.Z. Hu, G.D. Ehrlich, Strain-specific virulence phenotypes of *Streptococcus pneumoniae* assessed using the Chinchilla laniger model of otitis media, *PLoS One* 3 (4) (2008) e1969, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001969>.
 - [49] L.J. McAllister, A.D. Ogunniyi, U.H. Stroehrer, A.J. Leach, J.C. Paton, Contribution of serotype and genetic background to virulence of serotype 3 and serogroup 11 pneumococcal isolates, *Infect. Immun.* 79 (12) (2011) 4839–4849, <https://doi.org/10.1128/IAI.05663-11>.
 - [50] M.R. Oggioni, G. Pozzi, Comparative genomics for identification of clone-specific sequence blocks in *Streptococcus pneumoniae*, *FEMS Microbiol. Lett.* 200 (2) (2001) 137–143.
 - [51] K. Shen, J. Gladitz, P. Antalis, B. Dice, B. Janto, R. Keefe, J. Hayes, A. Ahmed, R. Dopico, N. Ehrlich, J. Jocz, L. Kropp, S. Yu, L. Nistico, D.P. Greenberg, K. Barbadora, R.A. Preston, J.C. Post, G.D. Ehrlich, F.Z. Hu, Characterization, distribution, and expression of novel genes among eight clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Infect. Immun.* 74 (1) (2006) 321–330, <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.321-330.2006>.
 - [52] L.J. McAllister, A.D. Ogunniyi, U.H. Stroehrer, J.C. Paton, Contribution of a genomic accessory region encoding a putative cellobiose phosphotransferase system to virulence of *Streptococcus pneumoniae*, *PLoS One* 7 (2) (2012) e32385, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032385>.
 - [53] F. Dickens, Oxidation of phosphohexonate and pentose phosphoric acids by yeast enzymes: Oxidation of phosphohexonate. II. Oxidation of pentose phosphoric acids, *Biochem. J.* 32 (9) (1938) 1626–1644.

- [54] D.B. Scott, S.S. Cohen, The oxidative pathway of carbohydrate metabolism in *Escherichia coli*. 1. The isolation and properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase, *Biochem. J.* 55 (1) (1953) 23–33.
- [55] M. Afzal, S. Shafeeq, O.P. Kuipers, LacR is a repressor of lacABCD and LacT is an activator of lacTFEG, constituting the lac gene cluster in *Streptococcus pneumoniae*, *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (17) (2014) 5349–5358, <https://doi.org/10.1128/AEM.01370-14>.
- [56] O.M. Neijssel, J.L. Snoep, M.J. Teixeira de Mattos, Regulation of energy source metabolism in streptococci, *J. Appl. Microbiol.* 83 (S1) (1997) 12–19, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.83.s1.2.x>.
- [57] P. Gaspar, F.A.Y. Al-Bayati, P.W. Andrew, A.R. Neves, H. Yesilkaya, Lactate dehydrogenase is the key enzyme for pneumococcal pyruvate metabolism and pneumococcal survival in blood, *Infect. Immun.* 82 (12) (2014) 5099–5109, <https://doi.org/10.1128/IAI.02005-14>.
- [58] H. Yesilkaya, F. Spissu, S.M. Carvalho, V.S. Terra, K.A. Homer, R. Benisty, N. Porat, A.R. Neves, P.W. Andrew, Pyruvate formate lyase is required for pneumococcal fermentative metabolism and virulence, *Infect. Immun.* 77 (12) (2009) 5418–5427, <https://doi.org/10.1128/IAI.00178-09>.
- [59] C.R. Melchiorson, K.V. Jokumsen, J. Villadsen, M.G. Johnsen, H. Israelsen, J. Arnuu, Synthesis and posttranslational regulation of pyruvate formate-lyase in *Lactococcus lactis*, *J. Bacteriol.* 182 (17) (2000) 4783–4788.
- [60] A.R. Neves, R. Ventura, N. Mansour, C. Shearman, M.J. Gasson, C. Maycock, A. Ramos, H. Santos, Is the glycolytic flux in *Lactococcus lactis* primarily controlled by the redox charge? Kinetics of NAD(+) and NADH pools determined in vivo by ¹³C NMR, *J. Biol. Chem.* 277 (31) (2002) 28088–28098, <https://doi.org/10.1074/jbc.M202573200>.
- [61] C.-Y. Chiu, G. Lin, M.-L. Cheng, M.-H. Chiang, M.-H. Tsai, S.-H. Lai, K.-S. Wong, S.-Y. Hsieh, Metabolomic profiling of infectious parapneumonic effusions reveals biomarkers for guiding management of children with *Streptococcus pneumoniae* pneumonia, *Sci. Rep.* 6 (2016) 24930, <https://doi.org/10.1038/srep24930>.
- [62] J.E. Heffner, L.K. Brown, C. Barbieri, J.M. DeLeo, Pleural fluid chemical analysis in parapneumonic effusions. A meta-analysis, *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 151 (6) (1995) 1700–1708, <https://doi.org/10.1164/ajrccm.151.6.7767510>.
- [63] L. Reitzer, Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*, *Annu. Rev. Microbiol.* 57 (2003) 155–176, <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090820>.
- [64] S. Basavanna, S. Khandavilli, J. Yuste, J.M. Cohen, A.H. Hosie, A.J. Webb, G.H. Thomas, J.S. Brown, Screening of *Streptococcus pneumoniae* ABC transporter mutants demonstrates that LivJHMGF, a branched-chain amino acid ABC transporter, is necessary for disease pathogenesis, *Infect. Immun.* 77 (8) (2009) 3412–3423, <https://doi.org/10.1128/IAI.01543-08>.
- [65] T. Härtel, M. Klein, U. Koedel, M. Rohde, L. Petruschka, S. Hammerschmidt, Impact of glutamine transporters on pneumococcal fitness under infection-related conditions, *Infect. Immun.* 79 (1) (2011) 44–58, <https://doi.org/10.1128/IAI.00855-10>.
- [66] A.R. Kerr, P.V. Adrian, S. Estevão, R. de Groot, G. Alloing, J.-P. Claverys, T.J. Mitchell, P.W.M. Hermans, The Ami-AltA/AltB permease of *Streptococcus pneumoniae* is involved in nasopharyngeal colonization but not in invasive disease, *Infect. Immun.* 72 (7) (2004) 3902–3906, <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.3902-3906.2004>.
- [67] H. Fischer, A. Tomasz, Peptidoglycan cross-linking and teichoic acid attachment in *Streptococcus pneumoniae*, *J. Bacteriol.* 163 (1) (1985) 46–54.
- [68] E. Eylert, J. Schär, S. Mertins, R. Stoll, A. Bacher, W. Goebel, W. Eisenreich, Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages, *Mol. Microbiol.* 69 (4) (2008) 1008–1017, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06337.x>.
- [69] G.A. Currie, L. Gyure, L. Cifuentes, Microenvironmental arginine depletion by macrophages in vivo, *Brit. J. Cancer* 39 (6) (1979) 613–620.
- [70] J.E. Albina, C.D. Mills, A. Barbul, C.E. Thirkill, W.L. Henry, B. Mastrofrancesco, M.D. Caldwell, Arginine metabolism in wounds, *Am. J. Physiol.* 254 (4 Pt 1) (1988) E459–E467.
- [71] G. Wu, Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition, *Amino Acids* 37 (1) (2009) 1–17, <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>.
- [72] J.R. Piet, M. Geldhoff, B.D.C. van Schaik, M.C. Brouwer, M. Valls Seron, M.E. Jakobs, K. Schipper, Y. Pannekoek, A.H. Zwinderman, T. van der Poll, A.H.C. van Kampen, F. Baas, A. van der Ende, D. van de Beek, *Streptococcus pneumoniae* arginine synthesis genes promote growth and virulence in pneumococcal meningitis, *J. Inf. Dis.* 209 (11) (2014) 1781–1791, <https://doi.org/10.1093/infdis/jit818>.
- [73] H.C. Ha, N.S. Sirisoma, P. Kuppasamy, J.L. Zweier, P.M. Woster, R.A. Casero, The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95 (19) (1998) 11140–11145, <https://doi.org/10.1073/pnas.95.19.11140>.
- [74] R.C. Goff, R.E. Hartman, Carbon dioxide fixation by cells of *Streptococcus faecalis* var. liquefaciens, *J. Bacteriol.* 104 (1) (1970) 27–33.
- [75] R.E. Hartman, Carbon dioxide fixation by extracts of *Streptococcus faecalis* var. liquefaciens, *J. Bacteriol.* 102 (2) (1970) 341–346.
- [76] V.F. Lachica, P.A. Hartman, Inhibition of CO₂ fixation in group D streptococci, *Can. J. Microbiol.* 15 (1) (1969) 57–60, <https://doi.org/10.1139/m69-009>.
- [77] W. Eisenreich, J. Slaghuys, R. Laupitz, J. Bussemer, J. Stritzker, C. Schwarz, R. Schwarz, T. Dandekar, W. Goebel, A. Bacher, ¹³C isotopologue perturbation studies of *Listeria monocytogenes* carbon metabolism and its modulation by the virulence regulator PrfA, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103 (7) (2006) 2040–2045, <https://doi.org/10.1073/pnas.0507580103>.
- [78] K.M. Herrmann, L.M. Weaver, The shikimate pathway, *Annu. Rev. Plant Physiol.* Plant Mol. Biol. 50 (1999) 473–503, <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.473>.
- [79] M.L. Gutierrez, X. Garrahou, E. Agosta, S. Servi, T. Parella, J. Joglar, P. Clapés, Serine hydroxymethyl transferase from *Streptococcus thermophilus* and L-threonine aldolase from *Escherichia coli* as stereocomplementary biocatalysts for the synthesis of beta-hydroxy-alpha, omega-diamino acid derivatives, *Chem. (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 14 (15) (2008) 4647–4656, <https://doi.org/10.1002/chem.200800031>.
- [80] L. Vidal, J. Calveras, P. Clapés, P. Ferrer, G. Caminal, Recombinant production of serine hydroxymethyl transferase from *Streptococcus thermophilus* and its preliminary evaluation as a biocatalyst, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68 (4) (2005) 489–497, <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1934-1>.
- [81] A.J. Wolfe, The acetate switch, *Microbiol. Mole. Biol. Rev.* MMBR 69 (1) (2005) 12–50, <https://doi.org/10.1128/MMBR.69.1.12-50.2005>.
- [82] A.J. Wolfe, Physiologically relevant small phosphodonors link metabolism to signal transduction, *Cur. Opin. Microbiol.* 13 (2) (2010) 204–209, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.002>.
- [83] S. Ramos-Montañez, K.M. Kazmierczak, K.L. Hentchel, M.E. Winkler, Instability of ackA (acetate kinase) mutations and their effects on acetyl phosphate and ATP amounts in *Streptococcus pneumoniae* D39, *J. Bacteriol.* 192 (24) (2010) 6390–6400, <https://doi.org/10.1128/JB.00995-10>.
- [84] B. Spellerberg, D.R. Cundell, J. Sandros, B.J. Pearce, I. Idanpaan-Heikkilä, C. Rosenow, H.R. Masure, Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*, *Mole. Microbiol.* 19 (4) (1996) 803–813.
- [85] H. Taniai, Iida K-i, M. Seki, M. Saito, S. Shiota, H. Nakayama, Yoshida S-i, Concerted action of lactate oxidase and pyruvate oxidase in aerobic growth of *Streptococcus pneumoniae*: Role of lactate as an energy source, *J. Bacteriol.* 190 (10) (2008) 3572–3579, <https://doi.org/10.1128/JB.01882-07>.
- [86] S. Ramos-Montañez, H.-C.T. Tsui, K.J. Wayne, J.L. Morris, L.E. Peters, F. Zhang, K.M. Kazmierczak, L.-T. Sham, M.E. Winkler, Polymorphism and regulation of the spxB (pyruvate oxidase) virulence factor gene by a CBS-HotDog domain protein (SpxR) in serotype 2 *Streptococcus pneumoniae*, *Mole. Microbiol.* 67 (4) (2008) 729–746, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06082.x>.
- [87] C.D. Pericone, S. Park, J.A. Imlay, J.N. Weiser, Factors contributing to hydrogen peroxide resistance in *Streptococcus pneumoniae* include pyruvate oxidase (SpxB) and avoidance of the toxic effects of the fenton reaction, *J. Bacteriol.* 185 (23) (2003) 6815–6825.
- [88] A.L. Sonenshein, The krebs citric acid cycle, in: A.L. Sonenshein, J.A. Hoch, R. Losick (Eds.), *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives, American Society of Microbiology*, 2002, pp. 151–162.
- [89] T.G. Kloosterman, W.T. Hendriksen, J.J.E. Bijlsma, H.J. Bootsma, Sacha A F T van Hijum, J. Kok, P.W.M. Hermans, O.P. Kuipers, Regulation of glutamine and glutamate metabolism by GlnR and GlnA in *Streptococcus pneumoniae*, *J. Biol. Chem.* 281 (35) (2006) 25097–25109, <https://doi.org/10.1074/jbc.M601661200>.
- [90] A. Bondi, J. Kornblum, M.D.S. Phalle, The amino acid requirements of penicillin resistant and penicillin sensitive strains of *Micrococcus pyogenes*, *J. Bacteriol.* 68 (5) (1954) 617–621.
- [91] B.E. Murray, K.V. Singh, R.P. Ross, J.D. Heath, G.M. Dunny, G.M. Weinstock, Generation of restriction map of *Enterococcus faecalis* OG1 and investigation of growth requirements and regions encoding biosynthetic function, *J. Bacteriol.* 175 (16) (1993) 5216–5223.
- [92] M.E. Tourtellotte, H.J. Morowitz, P. Kasimer, Defined medium for mycoplasma laidlaw II, *J. Bacteriol.* 88 (1964) 11–15.
- [93] A.M. Mitchell, T.J. Mitchell, *Streptococcus pneumoniae*: Virulence factors and variation, *Clin. Microbiol. Infect. Off. Pub. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16 (5) (2010) 411–418, <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03183.x>.
- [94] J.R. Zhang, K.E. Mostov, M.E. Lamm, M. Nanno, S. Shimida, M. Ohwaki, E. Tuomanen, The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells, *Cell* 102 (6) (2000) 827–837.
- [95] S. Voss, T. Hallström, M. Saleh, G. Burchhardt, T. Pribyl, B. Singh, K. Riesbeck, P.F. Zipfel, S. Hammerschmidt, The choline-binding protein PspC of *Streptococcus pneumoniae* interacts with the C-terminal heparin-binding domain of vitronectin, *J. Biol. Chem.* 288 (22) (2013) 15614–15627, <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.443507>.
- [96] U. Binsker, T.P. Kohler, K. Krauel, S. Kohler, H. Schwert, S. Hammerschmidt, Pneumococcal adhesins PavB and PspC are important for the interplay with human Thrombospondin-1, *J. Biol. Chem.* 290 (23) (2015) 14542–14555, <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.623876>.
- [97] V. Agarwal, S. Hammerschmidt, Cdc42 and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway are essential for PspC-mediated internalization of pneumococci by respiratory epithelial cells, *J. Biol. Chem.* 284 (29) (2009) 19427–19436, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.003442>.
- [98] I. Auzat, S. Chapuy-Regaud, G. Le Bras, D. Dos Santos, A.D. Ogunniyi, I. Le Thomas, J.R. Garel, J.C. Paton, M.C. Trombe, The NADH oxidase of *Streptococcus pneumoniae*: Its involvement in competence and virulence, *Mole. Microbiol.* 34 (5) (1999) 1018–1028.
- [99] P. Giammarinaro, J.C. Paton, Role of RegM, a homologue of the catabolite repressor protein CcpA, in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*, *Infect. Immun.* 70 (10) (2002) 5454–5461.
- [100] R. Iyer, A. Camilli, Sucrose metabolism contributes to in vivo fitness of *Streptococcus pneumoniae*, *Mole. Microbiol.* 66 (1) (2007) 1–13, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05878.x>.
- [101] L. Zeng, S.C. Choi, C.G. Danko, A. Siepel, M.J. Stanhope, R.A. Burne, Gene regulation by CcpA and catabolite repression explored by RNA-Seq in *Streptococcus mutans*, *PLoS one* 8 (3) (2013) e60465, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060465>.

- [102] T.L. Kinkel, K.S. McIver, CcpA-mediated repression of streptolysin S expression and virulence in the group A streptococcus, *Infect. Immun.* 76 (8) (2008) 3451–3463, <https://doi.org/10.1128/IAI.00343-08>.
- [103] J. Willenborg, M. Fulde, A. de Greeff, M. Rohde, H.E. Smith, P. Valentin-Weigand, R. Goethe, Role of glucose and CcpA in capsule expression and virulence of *Streptococcus suis*, *Microbiol. (Reading, England)* 157 (Pt 6) (2011) 1823–1833, <https://doi.org/10.1099/mic.0.046417-0>.
- [104] A.L. Zomer, G. Buist, R. Larsen, J. Kok, O.P. Kuipers, Time-resolved determination of the CcpA regulon of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363, *J. Bacteriol.* 189 (4) (2007) 1366–1381, <https://doi.org/10.1128/JB.01013-06>.
- [105] K. Seidl, S. Müller, P. Francois, C. Kriebitzsch, J. Schrenzel, S. Engelmann, M. Bischoff, B. Berger-Bachi, Effect of a glucose impulse on the CcpA regulon in *Staphylococcus aureus*, *BMC Microbiol.* 9 (2009) 95, <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-95>.
- [106] M.S. Moreno, B.L. Schneider, R.R. Maile, W. Weyler, M.H. Saier Jr., Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses, *Molec. Microbiol.* 39 (5) (2001) 1366–1381.
- [107] J. Deutscher, R. Herro, A. Bourand, I. Mijakovic, S. Poncet, P-Ser-HPr—a link between carbon metabolism and the virulence of some pathogenic bacteria, *Biochim. Biophys. Acta* 1754 (1–2) (2005) 118–125, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.07.029>.
- [108] S.J. Ahn, K.C. Rice, J. Oleas, K.W. Bayles, R.A. Burne, The *Streptococcus mutans* Cid and Lrg systems modulate virulence traits in response to multiple environmental signals, *Microbiol. (Reading, England)* 156 (Pt 10) (2010) 3136–3147, <https://doi.org/10.1099/mic.0.039586-0>.
- [109] R.P. Shivers, A.L. Sonenshein, Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids, *Mole. Microbiol.* 53 (2) (2004) 599–611, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04135.x>.
- [110] S.R. Brinsmade, R.J. Kleijn, U. Sauer, A.L. Sonenshein, Regulation of CodY activity through modulation of intracellular branched-chain amino acid pools, *J. Bacteriol.* 192 (24) (2010) 6357–6368, <https://doi.org/10.1128/JB.00937-10>.
- [111] M. Ratnayake-Lecamwasam, P. Serror, K.W. Wong, A.L. Sonenshein, *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels, *Genes Dev.* 15 (9) (2001) 1093–1103, <https://doi.org/10.1101/gad.874201>.
- [112] L.D. Handke, R.P. Shivers, A.L. Sonenshein, Interaction of *Bacillus subtilis* CodY with GTP, *J. Bacteriol.* 190 (3) (2008) 798–806, <https://doi.org/10.1128/JB.01115-07>.
- [113] D. Petranovic, E. Guedon, B. Sperandio, C. Delorme, D. Ehrlich, P. Renault, Intracellular effectors regulating the activity of the *Lactococcus lactis* CodY pleiotropic transcription regulator, *Molec. Microbiol.* 53 (2) (2004) 613–621, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04136.x>.
- [114] S. Caymaris, H.J. Bootsma, B. Martin, P.W. Hermans, M. Prudhomme, J.P. Claverys, The global nutritional regulator CodY is an essential protein in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*, *Molec. Microbiol.* 78 (2) (2010) 344–360.
- [115] P. Mellroth, R. Daniels, A. Eberhardt, D. Rönnlund, H. Blom, J. Widengren, S. Normark, B. Henriques-Normark, LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan, *J. Biol. Chem.* 287 (14) (2012) 11018–11029, <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318584>.
- [116] L.V. Howard, H. Gooder, Specificity of the autolysin of *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae*, *J. Bacteriol.* 117 (2) (1974) 796–804.
- [117] C. Fernández-Tornero, R. López, E. García, G. Giménez-Gallego, A. Romero, A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA, *Nature Struct. Biol.* 8 (12) (2001) 1020–1024, <https://doi.org/10.1038/nsb724>.
- [118] S. Giudicelli, A. Tomasz, Attachment of pneumococcal autolysin to wall teichoic acids, an essential step in enzymatic wall degradation, *J. Bacteriol.* 158 (3) (1984) 1188–1190.
- [119] D.E. Briles, S.K. Hollingshead, E. Swiatlo, A. Brooks-Walter, A. Szalai, A. Virolainen, L.S. McDaniel, K.A. Benton, P. White, K. Prellner, A. Hermansson, P.C. Aerts, H. van Dijk, M.J. Crain, PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines, *Microb. Drug Resist.* (Larchmont, N.Y.) 3 (4) (1997) 401–408, <https://doi.org/10.1089/mdr.1997.3.401>.
- [120] S. Hammerschmidt, S.R. Talay, P. Brandtzaeg, G.S. Chhatwal, SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component, *Molec. Microbiol.* 25 (6) (1997) 1113–1124.
- [121] M.J. Jedrzejewski, Pneumococcal virulence factors: Structure and function, *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 65 (2) (2001) 187–207, <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.187-207.2001>.
- [122] Q. Cheng, D. Finkel, M.K. Hostetter, Novel purification scheme and functions for a C3-binding protein from *Streptococcus pneumoniae*, *Biochem. J.* 39 (18) (2000) 5450–5457.
- [123] C. Rosenow, P. Ryan, J.N. Weiser, S. Johnson, P. Fontan, A. Ortqvist, H.R. Masure, Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*, *Molec. Microbiol.* 25 (5) (1997) 819–829.
- [124] R. Janulczyk, F. Iannelli, A.G. Sjöholm, G. Pozzi, L. Björck, Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function, *J. Biol. Chem.* 275 (47) (2000) 37257–37263, <https://doi.org/10.1074/jbc.M00457200>.
- [125] S. Dave, A. Brooks-Walter, M.K. Pangburn, L.S. McDaniel, PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H, *Infect. Immun.* 69 (5) (2001) 3435–3437, <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3435-3437.2001>.
- [126] S. Hammerschmidt, V. Agarwal, A. Kunert, S. Haelbich, C. Skerka, P.F. Zipfel, The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC protein of *Streptococcus pneumoniae* and mediates adhesion to host epithelial cells, *J. Immunol. (Baltimore, Md. 1950)* 178 (9) (2007) 5848–5858.
- [127] P. Rai, M. Parrish, L.J.J. Tay, N. Li, S. Ackerman, F. He, J. Kwang, V.T. Chow, B.P. Engelward, *Streptococcus pneumoniae* secretes hydrogen peroxide leading to DNA damage and apoptosis in lung cells, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 112 (26) (2015) E3421–30, <https://doi.org/10.1073/pnas.1424144112>.
- [128] I.M. Ward, K. Minn, K.G. Jorda, J. Chen, Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX, *J. Biol. Chem.* 278 (22) (2003) 19579–19582, <https://doi.org/10.1074/jbc.C300117200>.
- [129] A.J. Nakamura, V.A. Rao, Y. Pommier, W.M. Bonner, The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks, *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (2) (2010) 389–397, <https://doi.org/10.4161/cc.9.2.10475>.
- [130] M. Saleh, S.G. Bartual, M.R. Abdullah, I. Jensch, T.M. Asmat, I. Petruschka, T. Pribyl, M. Gellert, C.H. Lillig, H. Antelmann, J.A. Hermoso, S. Hammerschmidt, Molecular architecture of *Streptococcus pneumoniae* surface thioredoxin-fold lipoproteins crucial for extracellular oxidative stress resistance and maintenance of virulence, *EMBO Molec. Med.* 5 (12) (2013) 1852–1870, <https://doi.org/10.1002/emmm.201202435>.
- [131] S. Ribes, M.R. Abdullah, M. Saleh, U.-K. Hanisch, R. Nau, S. Hammerschmidt, Thioredoxins and methionine sulfoxide reductases in the pathophysiology of pneumococcal meningitis, *J. Infect. Dis.* 214 (6) (2016) 953–961, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw268>.
- [132] J.C. Paton, R.A. Lock, D.J. Hansman, Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with *Streptococcus pneumoniae*, *Infect. Immun.* 40 (2) (1983) 548–552.
- [133] M.K. Johnson, Cellular location of pneumolysin, *FEMS Microbiol. Lett.* 2 (5) (1977) 243–245, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1977.tb00951.x>.
- [134] J.A. Walker, R.L. Allen, P. Falmagne, M.K. Johnson, G.J. Boulnois, Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*, *Infect. Immun.* 55 (5) (1987) 1184–1189.
- [135] R. Lucas, I. Czika, S. Sridhar, E. Zemskov, B. Gorshkov, U. Siddaramappa, A. Oseghale, J. Lawson, A. Verin, F.G. Rick, N.L. Block, H. Pillich, M. Romero, M. Leustik, A.V. Schally, T. Chakraborty, Mini-review: Novel therapeutic strategies to blunt actions of pneumolysin in the lungs, *Toxins* 5 (7) (2013) 1244–1260, <https://doi.org/10.3390/toxins5071244>.
- [136] S.K.B. Cassidy, M.X.D. O'Riordan, More than a pore: the cellular response to cholesterol-dependent cytotoxins, *Toxins* 5 (4) (2013) 618–636, <https://doi.org/10.3390/toxins5040618>.
- [137] S.J. Tilley, E.V. Orlova, R.J.C. Gilbert, P.W. Andrew, H.R. Saibil, Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin, *Cell* 121 (2) (2005) 247–256, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.033>.
- [138] P. Rai, F. He, J. Kwang, B.P. Engelward, V.T.K. Chow, Pneumococcal pneumolysin induces DNA damage and cell cycle arrest, *Sci. Rep.* 6 (2016) 22972, <https://doi.org/10.1038/srep22972>.
- [139] S. Houldsworth, P.W. Andrew, T.J. Mitchell, Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes, *Infect. Immun.* 62 (4) (1994) 1501–1503.
- [140] R. Cockeran, A.J. Theron, H.C. Steel, N.M. Matola, T.J. Mitchell, C. Feldman, R. Anderson, Proinflammatory interactions of pneumolysin with human neutrophils, *J. Infect. Dis.* 183 (4) (2001) 604–611, <https://doi.org/10.1086/318536>.
- [141] E. Marrer, A.T. Satoh, M.M. Johnson, L.J.V. Piddock, M.G.P. Page, Global transcriptome analysis of the responses of a fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutant and its parent to ciprofloxacin, *Antimicrob. Ag. Chemoth.* 50 (1) (2006) 269–278, <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.269-278.2006>.
- [142] M.-J. Ferrández, A.G. de La Campa, The fluoroquinolone levofloxacin triggers the transcriptional activation of iron transport genes that contribute to cell death in *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (1) (2014) 247–257, <https://doi.org/10.1128/AAC.01706-13>.
- [143] M. Prudhomme, L. Attaiech, G. Sanchez, B. Martin, J.-P. Claverys, Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*, *Science (New York, N.Y.)* 313 (5783) (2006) 89–92, <https://doi.org/10.1126/science.1127912>.
- [144] C.C. Koch, D.J. Esteban, A.C. Chin, M.E. Olson, R.R. Read, H. Ceri, D.W. Morck, A.G. Buret, Apoptosis, oxidative metabolism and interleukin-8 production in human neutrophils exposed to azithromycin: effects of *Streptococcus pneumoniae*, *J. Antimicrob. Chemoth.* 46 (1) (2000) 19–26.
- [145] M.S. Butler, M.A. Blaskovich, M.A. Cooper, Antibiotics in the clinical pipeline in 2013, *J. Antibiot.* 66 (10) (2013) 571–591, <https://doi.org/10.1038/ja.2013.86>.
- [146] C.L.F. Walker, I. Rudan, L. Liu, H. Nair, E. Theodoratou, Z.A. Bhutta, K.L. O'Brien, H. Campbell, R.E. Black, Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea, *Lancet (London, England)* 381 (9875) (2013) 1405–1416, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60222-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60222-6).
- [147] World Health Organization Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance < http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf > .
- [148] R.N. Jones, M. Guzman-Blanco, A.C. Gales, B. Gallegos, A.L.L. Castro, M.D.V. Martino, S. Vega, J. Zurita, M. Cepparulo, M. Castanheira, Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011), *Braz. J. Infect. Dis. Off. Pub. Braz. Soc. Infect. Dis.* 17 (6) (2013) 672–681, <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.07.002>.
- [149] J.J. Picazo, Management of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infections and the use of pneumococcal conjugate vaccines, *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15 (Suppl 3) (2009) 4–6, [https://doi.org/10.1016/S0950-2688\(09\)80004-6](https://doi.org/10.1016/S0950-2688(09)80004-6).

- org/10.1111/j.1469-0691.2009.02723.x.
- [150] D. Felmingham, R. Canton, S.G. Jenkins, Regional trends in beta-lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001–2004, *J. Infect.* 55 (2) (2007) 111–118, <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2007.04.006>.
 - [151] T. Grebe, R. Hakenbeck, Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics, *Antimicrob. Agen. Chemoth.* 40 (4) (1996) 829–834.
 - [152] A.M. Smith, K.P. Klugman, Alterations in MurM, a cell wall mucopeptide branching enzyme, increase high-level penicillin and cephalosporin resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob. Agen. Chemoth.* 45 (8) (2001) 2393–2396, <https://doi.org/10.1128/AAC.45.8.2393-2396.2001>.
 - [153] A. Tomasz, M.L. de Vegvar, Construction of a penicillin-tolerant laboratory mutant of *Staphylococcus aureus*, *Eur. J. Clin. Microbiol.* 5 (6) (1986) 710–713.
 - [154] J.Y. El Khoury, N. Boucher, M.G. Bergeron, P. Leprohon, M. Ouellette, Penicillin induces alterations in glutamine metabolism in *Streptococcus pneumoniae*, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 14587, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15035-y>.
 - [155] P.E. Varaldo, M.P. Montanari, E. Giovanetti, Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci, *Antimicrob. Agen. Chemoth.* 53 (2) (2009) 343–353, <https://doi.org/10.1128/AAC.00781-08>.
 - [156] I. Cochetti, M. Vecchi, M. Mingoa, E. Tili, M.R. Catania, A. Manzin, P.E. Varaldo, M.P. Montanari, Molecular characterization of pneumococci with efflux-mediated erythromycin resistance and identification of a novel *mef* gene subclass, *mef(I)*, *Antimicrob. Agen. Chemoth.* 49 (12) (2005) 4999–5006, <https://doi.org/10.1128/AAC.49.12.4999-5006.2005>.
 - [157] M. Mingoa, M. Vecchi, I. Cochetti, E. Tili, L.A. Vitali, A. Manzin, P.E. Varaldo, M.P. Montanari, Composite structure of *Streptococcus pneumoniae* containing the erythromycin efflux resistance gene *mefI* and the chloramphenicol resistance gene *catQ*, *Antimicrob. Agen. Chemoth.* 51 (11) (2007) 3983–3987, <https://doi.org/10.1128/AAC.00790-07>.
 - [158] M.J. Ferrandiz, C. Ardanuy, J. Linares, J.M. Garcia-Arenzana, E. Cercenado, A. Fleites, Adela G de la Campa, New mutations and horizontal transfer of *rpoB* among rifampin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from four Spanish hospitals, *Antimicrob. Agen. Chemoth.* 49 (6) (2005) 2237–2245, <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2237-2245.2005>.
 - [159] C.A. Widdowson, K.P. Klugman, D. Hanslo, Identification of the tetracycline resistance gene, *tet(O)*, *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob. Agen. Chemoth.* 40 (12) (1996) 2891–2893.
 - [160] P.V. Adrian, K.P. Klugman, Mutations in the dihydrofolate reductase gene of trimethoprim-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob. Agen. Chemoth.* 41 (11) (1997) 2406–2413.
 - [161] T. Padayachee, K.P. Klugman, Novel expansions of the gene encoding dihydropteroate synthase in trimethoprim-sulfamethoxazole-resistant *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob. Agen. Chemoth.* 43 (9) (1999) 2225–2230.
 - [162] V.G. Meka, H.S. Gold, Antimicrobial resistance to linezolid, *Clin. Infect. Dis. Off. Pub. Infect. Dis. Soc. Am.* 39 (7) (2004) 1010–1015, <https://doi.org/10.1086/423841>.
 - [163] R.R. Reinert, M. van der Linden, A. Al-Lahham, Molecular characterization of the first telithromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolate in Germany, *Antimicrob. Agen. Chemoth.* 49 (8) (2005) 3520–3522, <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3520-3522.2005>.
 - [164] P.L. Ho, W.C. Yam, T.K. Cheung, W.W. Ng, T.L. Que, D.N. Tsang, T.K. Ng, W.H. Seto, Fluoroquinolone resistance among *Streptococcus pneumoniae* in Hong Kong linked to the Spanish 23F clone, *Emerg. Infect. Dis.* 7 (5) (2001) 906–908, <https://doi.org/10.3201/eid0705.010526>.
 - [165] L.L. Silver, Challenges of antibacterial discovery, *Clin. Microbiol. Rev.* 24 (1) (2011) 71–109, <https://doi.org/10.1128/CMR.00030-10>.
 - [166] W.J. Schwaible, K.B. Reid, Does properdin crosslink the cellular and the humoral immune response? *Immunol. Today* 20 (1) (1999) 17–21.
 - [167] Y.M. Ali, A. Hayat, B.M. Saeed, K.S. Haleem, S. Alshamrani, H.I. Kenawy, V.P. Ferreira, G. Saggi, A. Buchberger, P.J. Lachmann, R.B. Sim, D. Goundis, P.W. Andrew, N.J. Lynch, W.J. Schwaible, Low-dose recombinant properdin provides substantial protection against *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* infection, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 111 (14) (2014) 5301–5306, <https://doi.org/10.1073/pnas.1401011111>.
 - [168] H.Y. Lee, K.M. An, J. Jung, J.M. Koo, J.G. Kim, J.M. Yoon, M.J. Lee, H. Jang, H.S. Lee, S. Park, J.H. Kang, Identification of novel aminopiperidine derivatives for antibacterial activity against Gram-positive bacteria, *Bioorgan. Med. Chem. Lett.* (2016), <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.04.086>.
 - [169] L. Pillemer, L. Blum, I.H. Lepow, O.A. Ross, E.W. Todd, A.C. Wardlaw, The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena, *Science (New York, N.Y.)* 120 (3112) (1954) 279–285.
 - [170] B.D. Henry, D.R. Neill, K.A. Becker, S. Gore, L. Bricio-Moreno, R. Ziobro, M.J. Edwards, K. Muhlemann, J. Steinmann, B. Kleuser, L. Japtok, M. Luginbuhl, H. Wolfmeier, A. Scherag, E. Gulbins, A. Kadioglu, A. Draeger, E.B. Babychuk, Engineered liposomes sequester bacterial exotoxins and protect from severe invasive infections in mice, *Nature Biotechnol.* 33 (1) (2015) 81–88, <https://doi.org/10.1038/nbt.3037>.
 - [171] K. Lewis, Antibiotics: Recover the lost art of drug discovery, *Nature* 485 (7399) (2012) 439–440, <https://doi.org/10.1038/485439a>.
 - [172] D. Nichols, N. Cahoon, E.M. Trakhtenberg, L. Pham, A. Mehta, A. Belanger, T. Kanigan, K. Lewis, S.S. Epstein, Use of icip for high-throughput in situ cultivation of “uncultivable” microbial species, *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (8) (2010) 2445–2450, <https://doi.org/10.1128/AEM.01754-09>.
 - [173] L.L. Ling, T. Schneider, A.J. Peoples, A.L. Spoering, I. Engels, B.P. Conlon, A. Mueller, T.F. Schaberle, D.E. Hughes, S. Epstein, M. Jones, L. Lazarides, V.A. Steadman, D.R. Cohen, C.R. Felix, K.A. Fetterman, W.P. Millett, A.G. Nitti, A.M. Zullo, C. Chen, K. Lewis, A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance, *Nature* 517 (7535) (2015) 455–459, <https://doi.org/10.1038/nature14098>.
 - [174] V. Hauryliuk, G.C. Atkinson, K.S. Murakami, T. Tenson, K. Gerdes, Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology, *Nature Rev. Microbiol.* 13 (5) (2015) 298–309, <https://doi.org/10.1038/nrmicro3448>.
 - [175] K. Poole, Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance, *J. Antimicrob. Chemoth.* 67 (9) (2012) 2069–2089, <https://doi.org/10.1093/jac/dks196>.
 - [176] E. Wexselblatt, Y. Oppenheimer-Shaanan, I. Kaspy, N. London, O. Schueler-Furman, E. Yavin, G. Glaser, J. Katzhendler, S. Ben-Yehuda, Relacin, a novel antibacterial agent targeting the Stringent Response, *PLoS Pathogens* 8 (9) (2012) e1002925, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002925>.
 - [177] E. Wexselblatt, I. Kaspy, G. Glaser, J. Katzhendler, E. Yavin, Design, synthesis and structure-activity relationship of novel Relacin analogs as inhibitors of Rel proteins, *Eur. J. Med. Chem.* 70 (2013) 497–504, <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.10.036>.
 - [178] C. de La Fuente-Núñez, F. Reffuveille, E.F. Haney, S.K. Straus, R.E.W. Hancock, Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response, *PLoS Path.* 10 (5) (2014) e1004152, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004152>.
 - [179] Aszodi Jea, Neues Antibiotikum, Feglymycin, Verfahren zu seiner Herstellung und Verwendung (EP0848064 1998 A1).
 - [180] A. Hanchen, S. Rausch, B. Landmann, L. Toti, A. Nusser, R.D. Sussmuth, Alanine scan of the peptide antibiotic feglymycin: assessment of amino acid side chains contributing to antimicrobial activity, *Chembiochem. A Eur. J. Chem. Biol.* 14 (5) (2013) 625–632, <https://doi.org/10.1002/cbic.201300032>.
 - [181] R. Jansen, H. Irshik, V. Huch, D. Schummer, H. Steinmetz, M. Bock, T. Schmidt, A. Kirschning, R. Müller, Carolacton - a macrolide ketocarboxylic acid that reduces biofilm formation by the caries- and endocarditis-associated bacterium *Streptococcus mutans*, *Eur. J. Org. Chem.* 7 (2010) 1284–1289, <https://doi.org/10.1002/ejoc.200901126>.
 - [182] T. Schmidt, A. Kirschning, Total synthesis of carolacton, a highly potent biofilm inhibitor, *Angew. Chem. (Int. Ed. Engl.)* 51 (4) (2012) 1063–1066, <https://doi.org/10.1002/anie.201106762>.
 - [183] J. Donner, M. Reck, S. Bergmann, A. Kirschning, R. Müller, I. Wagner-Dobler, The biofilm inhibitor Carolacton inhibits planktonic growth of virulent pneumococci via a conserved target, *Sci. Rep.* 6 (2016) 29677, <https://doi.org/10.1038/srep29677>.